



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE - PGDRA**

**INDUÇÃO E DINÂMICA DE CRESCIMENTO DE CALOS
E DE SUSPENSÃO CELULAR DE
Capsicum frutescens CV. STROMBOLI**

ELOÍSA SANTANA PAZ

Porto Velho (RO)
2016



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - NCET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
REGIONAL E MEIO AMBIENTE - PGDRA**

**INDUÇÃO E DINÂMICA DE CRESCIMENTO DE CALOS
E DE SUSPENSÃO CELULAR DE
Capsicum frutescens CV. STROMBOLI**

ELOÍSA SANTANA PAZ

Orientador: Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, para a obtenção de Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Porto Velho (RO)
2016

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

Paz, Eloísa Santana.

P3481i

Indução e dinâmica de crescimento de calos e de suspensão celular de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli / Eloísa Santana Paz / Porto Velho, 2016.
58 fls.

Orientador: Prof. Maurício Reginaldo Alves dos Santos

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Fundação Universidade Federal de Rondônia.

1. Solanaceae - Pimenta. 2. Metabólitos secundários. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR. II. Título

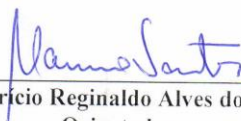
CDU 582.926.2

Bibliotecária responsável: Rejane Sales – CRB 11/903

ELOÍSA SANTANA PAZ

INDUÇÃO E DINÂMICA DE CRESCIMENTO DE CALOS E DE SUSPENSÃO
CELULAR DE *Capsicum frutescens* cv. Stromboli

Comissão Examinadora



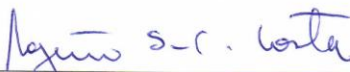
Dr. Mauricio Reginaldo Alves dos Santos
Orientador

Fundação Universidade Federal de Rondônia/Embrapa Rondônia



Dr. Vanderlei Maniesi
Membro Interno

Fundação Universidade Federal de Rondônia



Dr. Rogério Sebastião Correa da Costa
Membro Externo
Embrapa Rondônia

Porto Velho, 21 de outubro de 2016.

Resultado: APROVADA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Maria, e meus irmãos Anderson e Jéssica Santana, pelo amor, carinho, apoio e orações, vocês são a minha base, meu orgulho!

Aos meus sobrinhos Arthur e Ana Júlia, e ao meu primo Vinicius, por me darem o amor mais doce e puro de criança.

Ao meu companheiro, namorado e amigo André Luiz pelo apoio incondicional e por me fazer sentir a paz do verdadeiro amor.

À minha companheirinha de jornada de estudos, a que mais sabe de fisiologia vegetal no mundo, a minha Bombom.

A toda minha família que sempre esteve torcendo por mim, obrigada pela força e incentivo.

Ao meu orientador Dr. Maurício Reginaldo Alves dos Santos, por todo o aprendizado profissional que me proporcionou. Pelo apoio, pela sua dedicação, pelos seus conselhos e ensinamentos, pela oportunidade e parceria desde o princípio. Obrigada!

Às minhas companheiras de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Rondônia, Carolina Barros, Glaura Mugrabe, Carolina Augusto, Milene Guimarães, Pricianny Souza e Wanessa Nogueira. Em especial, Josilene Félix e Andrina Guimarães por todo o ensinamento e incentivo desde época da graduação.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela oportunidade de estágio e pelo suporte físico e material no desenvolvimento desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Fundação Universidade Federal de Rondônia.

Aos professores do PGDRA por todo o conhecimento transmitido. Aos colegas do Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, pelo companheirismo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a construção desse trabalho, obrigada!

Dedico,

A pessoa que mais amo nessa vida, o meu espelho,
meu porto seguro: minha querida MÃE.

Obrigada pelo incentivo, compreensão e amor.

“É impossível progredir sem mudança, e aqueles que não mudam suas mentes não podem mudar nada”.

George Bernard Shaw

“A mente que se abre a uma ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Atualmente, a preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos tem incentivado estudos sobre novas técnicas de controle de pragas e doenças que incidem sobre os sistemas agropecuários. Estas técnicas incluem a utilização de produtos naturais que sejam menos agressivos ao meio ambiente e que permitam a produção de alimentos sem risco para a saúde daqueles que irão consumi-los. Neste contexto, a prospecção de novos metabólitos secundários de plantas tem revelado um imenso potencial para substituição ao uso de inseticidas sintéticos. O objetivo deste trabalho é o estabelecimento de suspensões celulares *in vitro* a partir de explantes foliares de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli, visando à maximização da produção de metabólitos secundários de interesse agrônômico e pecuário. Segmentos foliares de plântulas estabelecidas *in vitro* foram individualmente inoculados em tubos de ensaio contendo meio Murashige & Skoog suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar, acrescido de combinações fatoriais dos reguladores de crescimento 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). Foram avaliadas a porcentagem de indução de calos (%IC), o percentual da área foliar coberta por células de calos (%AFCC) e a massa fresca dos explantes. Após avaliação dos resultados, foi realizado um refinamento experimental, no qual os explantes foram inoculados em meio contendo 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e avaliados quanto ao seu peso fresco após 49 dias. O tratamento mais responsivo foi 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D. Este meio foi utilizado para a obtenção de grande número de calos, com a subsequente determinação da curva de crescimento dos calos. A curva seguiu um padrão sigmoide, e a fase de desaceleração, quando as células de calos devem ser subcultivadas para o estabelecimento de suspensão celular, foi identificada entre o 39º e o 65º dia de cultivo. Células de calos aos 39 dias após a inoculação foram utilizadas para o estabelecimento de suspensão celular e o estudo do crescimento destes cultivos. A fase estacionária, quando a produção de metabólitos secundários nas suspensões celulares atinge seu máximo, foi identificada entre o 12º e o 13º dia de cultivo.

Palavras-chave: Solanaceae, pimenta, metabólitos secundários.

ABSTRACT

INDUCTION AND GROWTH DINAMICS OF CALLUS AND CELL SUSPENSION OF *Capsicum frutescens* CV. STROMBOLI. Currently, consumers' concerns about food quality have encouraged researches on new techniques for pest and diseases control that affect the agricultural systems. These techniques include the use of natural products which are less harmful to the environment and provide food production without risks to the health of those who will consume them. In this context, the prospection of new plant secondary metabolites has revealed an immense potential to replace the use of synthetic insecticides. The objective of this work is the *in vitro* establishment of cell suspensions from leaf explants of *Capsicum frutescens* cv. Stromboli, in order to maximize the production of secondary metabolites of agronomic and livestock interests. Leaf segments of *in vitro* established plantlets were individually inoculated into test tubes containing Murashige & Skoog medium supplemented with 30.0 g L⁻¹ sucrose, 6.0 g L⁻¹ agar and factorial combinations of the growth regulators 2,4-D (0.0, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 mg L⁻¹) and BAP (0.0; 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 mg L⁻¹). The percentage of callus induction (%CI), the percentage of leaf area covered by callus cells (%AFCC), and the fresh weight of explants were evaluated. After that, an experimental refinement was carried out, in which the explants were cultured in medium containing 0.0; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 3.0 and 4.0 mg L⁻¹ 2,4-D and had their fresh weight evaluated after 49 days. The more responsive treatment was 1.5 mg L⁻¹ 2,4-D. This medium was used to obtain large number of callus and the subsequent determination of the callus growth curve. The curve followed a sigmoid pattern, and the deceleration phase, when the callus cells have to be subcultured in order to produce a cell suspension, was identified between the 39th and the 65th day of cultivation. Callus cells at 39 days after inoculation were used for the establishment of cell suspension and the study of the cultivation growth. The stationary phase, when the production of secondary metabolites in cell suspensions reaches its maximum, was identified between the 12^h and the 13th day of culture.

Key words: Solanaceae, chili pepper, secondary metabolites.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Aspecto geral de plantas de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli. 16
- Figura 2** - Explantes foliares de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg.L⁻¹), após 49 dias de cultivo. 29
- Figura 3** - Médias do peso da massa fresca (g) de calos em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). 34
- Figura 4** - Médias do peso da massa fresca (g) de calos em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹). 34
- Figura 5** - Calos de *C. frutescens* cv. Stromboli inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D (1,5 mg L⁻¹) A – 1º dia de cultivo; B – 14 dias; C – 28 dias; D – 42 dias; E - 56 dias e F – 70 dias de cultivo. 36
- Figura 6** - Curva de crescimento de calos de *C. frutescens* cv. Stromboli obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 70 dias de cultivo. 37
- Figura 7** - Curva de crescimento de células em suspensão em função da duração da cultura no meio MS líquido suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 15 dias de cultivo. 39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias da área foliar coberta por células de calo (AFCC) em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 49 dias de cultivo. 31
- Tabela 2** - Médias do peso da massa fresca de calos em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 49 dias de cultivo. 33

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	Benzilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético
AIA	Ácido Indolacético
AIB	Ácido Indol Butírico
ANA	Ácido Alfa- Naftalenoacético
KIN	Cinetina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
v/v	Volume por volume
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro Quadrado
MS	Murashige & Skoog
pH	Potencial de Hidrogênio
mg L ⁻¹	Miligrama por Litro
g L ⁻¹	Grama por Litro
ml	Mililitro
μM	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1. OBJETIVOS	14
1.1 GERAL.....	14
1.2 ESPECÍFICOS.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 GÊNERO <i>Capsicum</i>	15
2.2 ESPÉCIE <i>Capsicum frutescens</i>	16
2.3 BIOATIVIDADES.....	17
2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	19
2.5 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS E CALOGÊNESE.....	20
2.6 REGULADORES DE CRESCIMENTO.....	21
2.7 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS DE CALOS.....	22
2.8 SUSPENSÃO CELULAR PARA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	22
3. CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES E PRODUÇÃO DOS EXPLANTES.....	26
4.2 INDUÇÃO DE CALOS.....	26
4.3 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS.....	27
4.4 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1 INDUÇÃO DE CALOS.....	29
5.2 ÁREA FOLIAR COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS.....	31
5.3 MASSA FRESCA.....	33
5.4 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS.....	35
5.5 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO.....	38
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICES	52

INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios dos sistemas de produção agropecuários é atender à crescente demanda pela oferta de alimentos produzidos com mais eficiência e isentos de efeitos prejudiciais e ao meio ambiente e à saúde daqueles que irão consumi-los, principalmente no que diz respeito à ausência de resíduos químicos utilizados no combate de pragas e agentes infecciosos que incidem sobre os sistemas agropecuários.

Atualmente, pesquisas relativas a produtos agropecuários derivados de plantas têm se intensificado e evidenciado o enorme potencial destas substâncias, que são biodegradáveis ou não apresentam toxicidade e são potencialmente adequadas para uso no manejo integrado de pragas e doenças.

Nesse sentido, os metabólitos secundários, conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes, além da defesa contra os herbívoros, insetos e infecção por microorganismos patogênicos, têm se mostrado uma imensa fonte para a descoberta de substâncias bioativas e para o desenvolvimento de novos produtos.

No gênero *Capsicum* já foram detectados os capsaicinoides, metabólitos secundários do grupo químico dos alcaloides presentes em seus frutos, com diversos benefícios para a saúde humana e outros compostos de interesse agrônomo, tais como flavonoides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais, o que fazem desse gênero alvo de pesquisas como alternativas ao uso de controle de parasitoses.

As técnicas de cultura de tecidos vegetais podem ser promissoras para a exploração do potencial de plantas produtoras de substâncias bioativas, pois possibilita a produção de metabólitos secundários *in vitro* em sistemas conhecidos como suspensões celulares. Este método é utilizado para o cultivo *in vitro* em larga-escala de células vegetais, a partir das quais metabólitos secundários são extraídos. A grande vantagem deste método é a produção contínua e confiável de produtos naturais. Outras vantagens relevantes são a eliminação de potenciais barreiras políticas e geográficas contra a produção de metabólitos a partir de cultivos convencionais; independência de condições climáticas e edáficas e da ocorrência de pragas e doenças; possibilidade de produção de metabólitos em larga-escala a custo relativamente baixo por períodos indefinidos de tempo. Neste contexto, vários fatores influenciam o acúmulo de metabólitos secundários nas células em suspensão, sendo o mais importante à constituição química do meio de cultivo em relação aos reguladores de crescimento.

Esta pesquisa é parte de um projeto que está em andamento na Embrapa Rondônia, no qual metabólitos secundários de espécies de *Capsicum* produzidos *in vitro* serão testados no controle de pragas e doenças que afetam a agricultura e a pecuária na região Norte do Brasil. Diante da importância e carência de estudos relacionados à produção *in vitro* de metabólitos secundários pela espécie *C. frutescens*, este trabalho consiste em estabelecer sistemas de suspensões celulares de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli. Com o trabalho proposto, espera-se maximizar e padronizar a produção de biomoléculas passíveis de utilização como alternativas ecologicamente adequadas para substituir os produtos sintéticos atualmente utilizados pela pecuária na região Amazônica.

1. OBJETIVOS

1.1 GERAL

Estabelecimento de suspensões celulares de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli, visando à maximização da produção de metabólitos secundários de interesse agrônômico e pecuário.

1.2 ESPECÍFICOS

1. Determinar um protocolo para indução de calos friáveis em explantes foliares de *C. frutescens* cv. Stromboli;
2. Estudar o padrão de crescimento dos calos, visando à identificação das fases de crescimento, com foco na fase de desaceleração, quando os calos devem ser repicados;
3. Estabelecer culturas de células de calos em suspensão e determinar a curva de crescimento, identificando a fase estacionária, quando a produção de metabólitos secundários é máxima.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GÊNERO *Capsicum*

O gênero *Capsicum* pertence à família Solanaceae e é originário de zonas tropicais e úmidas da América Central e do Sul. Apresenta 33 espécies, o que compreende uma grande variedade de pimentas e pimentões, descritas como domesticadas, semidomesticadas e silvestres. Apenas cinco espécies são cultivadas: *Capsicum annuum* L., *Capsicum baccatum* L., *Capsicum chinense* Jacq., *Capsicum frutescens* L. e *Capsicum pubescens* L. (COSTA et al., 2015; MENICHINI et al., 2009; DUTRA, 2010).

Os indígenas foram os primeiros consumidores de pimenta *Capsicum* e a utilizavam para conservar e temperar suas comidas. Com a chegada dos espanhóis e portugueses a pimenta foi disseminada para todo o mundo, tornando-se uma das especiarias picantes mais consumidas (RIBEIRO et al., 2008; WAGNER, 2003). Acredita-se também que a dispersão desse gênero possa ter sido feita por pássaros migratórios que, ao irem de uma região para outra, distribuíam as sementes em novas áreas (WITT, 1999).

Esse gênero é representado por plantas arbustivas, com caule semi lenhoso, que pode ultrapassar 1,0 m de altura. Apesar de perenes, são cultivadas como plantas herbáceas anuais. São preferencialmente autógamas, o que facilita a sua reprodução, embora a polinização cruzada, por intermédio de abelhas e outros insetos, também possa ocorrer entre indivíduos dentro da mesma espécie e entre espécies do mesmo gênero (FILGUEIRA, 2008; CARVALHO & BIANCHETTI, 2004). Além disso, possuem grande variabilidade quanto às suas principais características morfológicas, como formato, tamanho, cor e posição de flores e frutos, entre outras (FILGUEIRA, 2008).

Devido à grande variabilidade morfológica desse gênero, além da classificação em espécie, variedade e cultivar (CARVALHO et al., 2003), também pode ser classificado por complexos de espécies, que reúnem os indivíduos passíveis de cruzamento entre si. Atualmente, estão estabelecidos três complexos: 1) *C. annuum*, que inclui as espécies *C. annuum*, *C. frutescens* e *C. chinense*; 2) *C. baccatum*, formado apenas pela espécie *C. baccatum* var. *pendulum*; e 3) *C. pubescens*, também constituído de somente uma espécie, *C. pubescens* (BOSLAND & VOTAVA, 1999).

2.2 ESPÉCIE *Capsicum frutescens*

A espécie *Capsicum frutescens* está distribuída por toda a América Central e planícies da América do Sul, e também em outras regiões tropicais e subtropicais, tais como Ásia, África, e ilhas do Pacífico. Essa espécie é geralmente muito picante e tem um sabor característico que realça o gosto dos alimentos. É a espécie domesticada com menor variabilidade morfológica (REIFSCHNEIDER, 2000).

Apresenta plantas perenes e de maturação tardia, a altura pode variar de 1,5–2,0 metros, com uma flor por nó, ocasionalmente fasciculada, que possui corola de cor branca esverdeada, sem mancha na base das pétalas, sendo que as anteras, em geral, são púrpura, azul, roxas, violetas ou amarelas. A presença de vários caules e o tipo arbustivo, caules e folhas glabros a muito pubescentes; folhas maleáveis; e sementes cor creme a amarelo, também caracterizam essa espécie. Os frutos geralmente são pequenos, alongados, eretos, com parede muito delgada e polpa mole quando imaturo, variando de verde a branco amarelado; fruto maduro vermelho a laranja escuro (YAMAMOTO & NAWATA, 2005; REIFSCHNEIDER, 2000; VIÑALS et al., 1996).

A pimenta *C. frutescens* cv. Stromboli (Figura 1) registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), se caracteriza por ser uma planta compacta de crescimento determinado, adaptada para climas tropicais, podendo ser cultivada na primavera, verão e outono. É indicada para cultivo em campo aberto, estufas e vasos. O seu ciclo é tardio. Os frutos alcançam em média 3,0 cm de comprimento e 1,0 cm de largura. A coloração vai de verde escuro a laranja, conforme o amadurecimento (RIBEIRO et al., 2008).

Figura 1- Aspecto de plantas de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli.



Fonte: Produção da autora

Apesar de ser uma pimenta ornamental, por possuir caracteres que conferem valor estético, como folhagem variegada, pequeno porte e frutos de coloração intensa que contrastam com a folhagem, pode ser consumida como as demais pimentas (CARVALHO et al., 2006). Esta variedade é picante, com grau de pungência entre 15.000 a 30.000 unidades de Scoville (RIBEIRO et al., 2008).

Esta variedade de pimenta é semelhante à pimenta Etna na forma como os frutos maduros em cachos eretos na parte superior da planta, tornando-a incrivelmente atraente em vasos e no jardim. A Stromboli é altamente produtiva e produz quantidades significativas de pimentas, que são mais longas e mais finas do que a Etna e quando maduras apresentam uma atraente cor laranja (RIBEIRO et al., 2008).

2.3 BIOATIVIDADES

As pimentas e pimentões pertencentes ao gênero *Capsicum* são fontes de compostos bioativos de reconhecido benefício à saúde humana, dentre eles podem ser citados, compostos fenólicos, fibras, capsaicinóides, carotenóides, vitaminas C e E, e outros metabólitos secundários com propriedades antioxidantes (GIUFFRIDA et al., 2013; PINTO et al., 2013; EGGINK et al., 2012).

As pimentas, além de consumidas *in natura*, podem ser processadas e utilizadas em diversas linhas de produtos na indústria de alimentos, como condimentos, molhos, conservas, corantes (MADAIL et al., 2005). Na indústria farmacêutica são utilizadas para composição de pomadas para artrite e artrose. Na indústria de cosméticos são utilizadas para xampus antiqueda e anticaspa e na indústria bélica para fabricação de aerossóis de defesa (HENZ & COSTA, 2005).

A pungência (sabor picante) é o principal atributo das pimentas e é diretamente relacionada com a concentração dos capsaicinóides, um grupo de alcalóides naturalmente produzidos nas células epidérmicas da placenta dos frutos (PINTO et al., 2013; WAGNER, 2003).

Os capsaicinóides são compostos restritos ao gênero *Capsicum* (LEE et al., 2008) responsáveis pela ardência apresentada por muitas variedades de espécies de pimentas, sendo que o grau de pungência varia entre espécies e variedades (KRAIKRUAN et al., 2008). Dentre os 14 tipos identificados de capsaicinóides, os que ocorrem em maior quantidade são a

capsaicina, a diidrocapsaicina e a nordiidrocapsaicina, sendo que essas substâncias variam conforme a maturação do fruto (SIMÕES et al., 2010).

A capsaicina é descrita como uma substância química medicinal com base em suas propriedades antioxidantes, antiinflamatória, antimutagênica, quimiopreventiva, carminativa, bactericida, anticancerígena, anti-hemorragica, expectorante e descongestionante. Atua como estimulante do apetite e auxilia na digestão e na dissolução de coágulos sanguíneos, previne a arteriosclerose, controla o colesterol, é indutora da termogênese, aumentando o gasto calórico e influencia na liberação de endorfinas, funcionando como analgésico natural (PINTO et al., 2013; BONTEMPO, 2007).

Kazem & El-Shereif (2010) testaram extratos xilênicos de *Capsicum* em pulgões e ácaros, onde foi possível observar a eficácia da solução por meio do índice de letalidade nas amostras. Madhumathy et al. (2007) também avaliaram a toxicidade do extrato etanólico de *C. annum* em larvas de *Anopheles stephensi* (vetor da malária) e *Culex quinquefasciatus* (mosquito comum), demonstrando uma alta taxa de mortalidade nas duas espécies.

Nascimento et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de hexano e acetonitrilo de fruto inteiro, casca e sementes de pimenta Tabasco (*C. frutescens*) em estirpes de bactérias Gram negativo (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*), Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*) e em uma levedura (*Candida albicans*), detectando a existência de uma atividade inibitória significativa contra as estirpes bacterianas. Já Soumya & Nair (2012) utilizaram extrato aquoso de folhas e frutos em fungos associados com o armazenamento de amendoim, onde o extrato de folha foi mais eficaz para *Aspergillus flavus*, enquanto o extrato de frutos apresentou forte atividade contra *A. niger*.

Vinakaya et al. (2010) utilizando extratos de folhas em metanol de *C. frutescens*, observaram atividade antibacteriana positiva para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella Pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e atividade anti-helmíntica ao testar o extrato em minhoca adulta (*Pheretima posthuma*) semelhante anatomicamente e fisiologicamente com o verme que parasita o intestino de seres humanos.

Diante disso, torna-se crescente a utilização das espécies do gênero *Capsicum* em diversas áreas, e atualmente na agricultura, pelo potencial inseticida e de repelência, encontradas nas substâncias provenientes do metabolismo secundário, tais como alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas e óleos essenciais (LUZ, 2007).

2.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

As plantas produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários atuam diretamente no desenvolvimento e metabolismo da planta; já os metabólitos secundários são produtos do metabolismo primário e em geral não tem função direta no crescimento e desenvolvimento da planta (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Ao contrário dos primários que se encontram em todas as células vegetais e são necessárias para a vida da planta, como os açúcares simples, os aminoácidos, as proteínas e os ácidos nucleicos, os metabólitos secundários são restritos em sua distribuição, tanto dentro da planta quanto entre plantas de diferentes espécies. Cada família, gênero e espécie produz uma categoria química característica ou uma mistura delas, e estas, por vez, podem ser utilizadas como caracteres taxonômicos na classificação das plantas (BERG & LUBERT, 2008; WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008).

A produção dos compostos secundários ocorre em um órgão ou tecido específico, tipo de célula em um determinado estágio de desenvolvimento ou em vários sítios dentro dela, sendo armazenados em princípio dentro de vacúolos. Há variações na concentração destes metabólitos e geralmente estes são sintetizados em uma parte da planta e armazenados em outra (RAVEN et al., 2001).

Os metabólitos secundários tem a função de proteger a planta contra herbívoros, ataque de patógenos, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de polinizadores, de animais dispersores de sementes, bem como microrganismos simbiotes. Acrescidos a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de fatores abióticos externos, como temperatura, umidade, proteção contra raios UV e deficiência de nutrientes minerais (SIMÕES et al., 2010; ALVES, 2001).

Estudos sobre metabólitos foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX devido às suas diversas aplicações (TAIZ & ZEIGER, 2009), o que até hoje desperta o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que visam neles uma importante fonte de moléculas potencialmente úteis ao homem (SANTOS, 2000). Muitos metabólitos são de valor comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentícia, agrônômica, cosmética, entre outras (SIMÕES et al., 2010). A abrangente atuação dos metabólitos secundários dos vegetais mostra a necessidade e a importância do conhecimento

sobre esses compostos. Entender a sua atuação pode levar a inúmeras possibilidades de estudos que direcionem a busca pela solução de importantes problemas enfrentados atualmente como a resistência microbiana às drogas sintéticas ou o prejuízos causados pelo uso desordenado de pesticidas (BEZERRA, 2008).

Nesse contexto inserem-se os metabólitos secundários do gênero *Capsicum*, com potencial para aplicação em diversas áreas, ressaltando-se sua importância econômica na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e, atualmente, agropecuária (MAPELI et al., 2011).

2.5 CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS E CALOGÊNESE

A cultura de tecidos vegetais representa uma das áreas de maior êxito da biotecnologia com grandes aplicações na agricultura por meio da engenharia genética, conservação de germoplasmas e na indústria de produção de metabólitos secundários, tendo em vista sua elevada produção em condições *in vitro* (ARIKAT et al., 2004; RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002; BOTTA et al., 2001). Nestas técnicas, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados de explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado (TORRES et al., 2000).

Nos tecidos vegetais utilizados como explantes, a desdiferenciação celular, onde as células diferenciadas retornam ao estado meristemático não diferenciado, pode resultar na formação de calos com células ou grupos de células competentes. Quando estas são transferidas para meios indutores, tornam-se determinadas, ou seja, comprometidas a uma rota específica de desenvolvimento (TORRES et al., 2000).

A formação de calos em um explante, denominada como calogênese, é influenciada pelo genótipo, pelo tipo de explante, pela constituição do meio cultura e pelo ambiente de cultivo. Considerando a influência do explante, é recomendada a utilização daqueles que contêm maior proporção de tecido meristemático, ou que apresentam maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

A calogênese ocorre com diferentes concentrações de reguladores de crescimento conforme a espécie e a parte da planta utilizada, sendo as auxinas e citocininas as classes mais utilizadas. Auxinas promovem, geralmente em combinação com as citocininas, o crescimento de calos, suspensões celulares e órgãos, além de regular a morfogênese (GEORGE et al., 2008a).

Calos com diferentes taxas de crescimento e níveis de diferenciação, friáveis ou compactos, podem diferir quanto à capacidade de sintetizar compostos bioativos. Alguns calos são compactos e crescem vagarosamente, outros são friáveis e desintegram-se facilmente quando manipulados. Recentemente, o cultivo de calos tem sido uma alternativa viável para o estudo e a produção de metabólitos secundários (FLORES, 2006). Para isso, faz-se necessário determinar protocolos para a indução e manutenção de calos friáveis.

2.6 REGULADORES DE CRESCIMENTO

Os reguladores de crescimento são substâncias químicas sintéticas que possuem ação similar aos fitorreguladores e que atuam em baixas concentrações em vários processos de desenvolvimento das plantas. São comumente adicionados ao meio de cultura para suprir as possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz (LAMAS, 2001; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura *in vitro* (CALDAS et al., 1998). As auxinas são geralmente utilizadas quando o propósito é o alongamento celular, a expansão dos tecidos e divisão celular (formação de calo), a formação de raízes e a embriogênese dos cultivos em suspensão; já as citocininas são frequentemente utilizadas para estimular o crescimento e desenvolvimento de brotações múltiplas (GEORGE et al., 2008b; PIERIK, 1990).

As auxinas mais utilizadas são o ácido indol-butírico (AIA), o ácido naftaleno-acético (ANA) e o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). As duas primeiras são, geralmente, utilizadas na fase de enraizamento e organogênese, e a última na indução de calos e embriogênese somática (COSTA et al., 2008; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

As citocininas são fundamentais para a multiplicação da parte aérea e para a indução de gemas adventícias. A concentração e o tipo de citocinina são os fatores que mais influenciam a multiplicação *in vitro* (SOARES et al., 2011). A benzilaminopurina, conhecida como BAP, é a citocinina mais utilizada, seguida da cinetina (KIN). Essa citocinina tem sido empregada na maioria dos experimentos, mas para determinadas espécies de plantas, outras citocininas podem ser mais eficientes (TOMBOLATO & COSTA, 1998).

A indução de calos friáveis é geralmente favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, assim como pela adição de outros componentes ao meio de cultivo, ou

mesmo pelo genótipo empregado (PESCADOR et al., 2000). Entretanto, é considerado por alguns autores que o crescimento de calo em diferentes espécies pode ser: (1) independente de citocinina e de auxina; (2) dependente de auxina; (3) dependente de citocinina ou (4) dependente de ambas, auxina e citocinina (PREECE, 2008).

2.7 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS DE CALOS

No processo de calogênese é importante estabelecer a curva de crescimento de calos, a partir da qual é possível determinar o momento exato da repicagem dos mesmos para um meio fresco ou a possibilidade de sua utilização em suspensões celulares, visando à otimização da produção de metabólitos (GEORGE et al., 2008a).

O crescimento dos calos *in vitro*, com conformação sigmoide, apresenta em geral seis fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio. Na *fase lag*, as células do explante preparam-se para a divisão celular, com maior produção de energia. Ocorre o início da mobilização de metabólitos primários, as células não sofrem divisão celular, há síntese de proteínas e de compostos específicos. Começa o crescimento dos calos. A próxima fase é a *exponencial* ou biosintética, a qual é caracterizada pela divisão celular intensa, todavia em tamanhos pequenos, com a formação de agregados de células. Na *fase linear* há diminuição da divisão celular, mas aumento de volume celular. Na *fase de desaceleração* há diminuição no crescimento, devido à redução de nutrientes, acúmulo de produtos tóxicos, secagem do ágar e redução do oxigênio no interior das células. Nesta fase deve-se realizar o processo de repicagem ou subcultivo das células de calos em meio líquido sob agitação, visando ao estabelecimento de suspensões celulares, se for este o objetivo da indução. Na *fase estacionária* ocorre maior acúmulo de metabólitos secundários. As culturas não podem ser mantidas muito tempo nessa fase. Na *fase de declínio*, os calos iniciam um processo de degradação (SMITH, 2012; CASTRO et al., 2008; ARNALDOS et al., 2001;).

2.8 SUSPENSÃO CELULAR PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A produção de metabólitos secundários empregando cultura de células de plantas vem sendo amplamente estudada (CHARLET et al., 2000). As plantas que produzem compostos bioativos são frequentemente obtidas a partir de coleta predatória e indiscriminada, e por isso as pesquisas visando à produção destes metabólitos secundários em cultura *in vitro* são

vantajosas tanto do ponto de vista ecológico como econômico (FUMAGALI et al., 2008; VILLAREAL et al., 1997).

A cultura de células em suspensão fornece uma série de vantagens sobre os estudos com plantas íntegras, incluindo a síntese de grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de um período de cultivo menor, e a baixo custo, extraídos de células relativamente uniformes e sem interferência de microrganismos (CROTEAU et al., 2000). Além disso, a produção *in vitro* de compostos secundários sob condições controladas evita flutuações nas concentrações devido a variações geográficas, sazonais e ambientais (MURTHY et al., 2014), fornece uma fonte contínua e segura de produtos naturais, os quais podem ser produzidos de formas semelhantes ou superiores aos das plantas inteiras, sem interferência de barreiras políticas e geográficas (VANISREE et al., 2004).

Os sistemas de cultura de células em suspensão são utilizados para a obtenção e proliferação de células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, para evitar possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura, além de ser uma técnica eficiente de multiplicação rápida (PEREIRA & MELO, 2004).

Sendo assim, para o estabelecimento da suspensão celular, transfere-se uma porção de calos friáveis para o meio líquido, mantendo-os sob condições adequadas de agitação, aeração, temperatura e iluminação. A obtenção de uma suspensão celular homogênea dependerá da escolha do explante, da textura do calo e do meio de cultura, pois são fatores que influenciam no desenvolvimento de uma massa celular uniforme (CHATTOPADHYAY et al., 2007).

Nessa perspectiva, o cultivo de células em suspensão é uma alternativa viável para a produção de metabólitos secundários, pois utiliza células totipotentes que possuem a informação genética necessária para a síntese de metabólitos secundários encontrados na planta-mãe e/ou a descoberta de novos compostos normalmente não encontrados na planta matriz que podem apresentar atividades biológicas interessantes para a sociedade (RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKARN, 2002).

3 CONTRIBUIÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO REGIONAL

Os debates em torno do tema desenvolvimento têm feito alusão a uma nova forma de perceber os problemas atuais, sobressaindo-se a ideia de que os mesmos não podem ser entendidos isoladamente. O desenvolvimento, em qualquer concepção, deve resultar do crescimento econômico juntamente com a melhoria na qualidade de vida, ou seja, deve incluir “as alterações da composição do produto e a alocação de recursos pelos diferentes setores da economia, de forma a melhorar os indicadores de bem-estar econômico e social” (VASCONCELOS & GARCIA, 1998).

O desenvolvimento regional liga numa perspectiva os conhecimentos de desenvolvimento humano e desenvolvimento sustentável. O desenvolvimento humano é uma medida global da qualidade de vida e a expansão de suas capacitações, o qual possui diversas dimensões, enquanto o desenvolvimento sustentável é aquele capaz de atender as nossas necessidades presentes, sem prejuízo para as gerações futuras. Implica, ademais, uma transformação progressiva da economia e da sociedade, aumentando o potencial produtivo e assegurando a igualdade de oportunidades para todos. Há uma proximidade entre os dois conceitos, sendo que ambos vão além da simples perspectiva econômica. É nesse sentido que surge o conceito de desenvolvimento rural sustentável, o que nada mais é que a materialização da sustentabilidade para os territórios rurais, a partir de novas concepções sobre modelos de produção e relações sociais no campo (COSTABEBER & CAPORAL, 2003).

Encontrar formas de garantir o desenvolvimento regional com a preservação do ambiente natural é um grande desafio para todos os setores, tanto para as universidades como para as empresas de pesquisa de ciência e tecnologia da região. Atualmente, a mobilização da sociedade, organizada em defesa do meio ambiente vem alterando as prioridades sócio-políticas e de ciência, tecnologia e inovação para os setores agropecuário e florestal (OLIVEIRA, 2011).

A agropecuária é representativa para o estado de Rondônia, em função do agronegócio que são gerados com a produção advinda da agricultura e da pecuária. A agricultura responde por um percentual menor do valor adicionado, ficando a maior parte com a pecuária de corte e de leite (SEPOG, 2014). O Estado é o maior produtor de leite da região Norte, cuja produção corresponde a 43,2% de toda produção regional, com uma produção de 717 milhões litros por ano. Também tem se revelado como importante produtor de carne bovina, responsável por

10,3% de toda a exportação de carne desossada e congelada, e por 83,2% da exportação para a região Norte (IDARON, 2013; BRITO, 2011; MEIRELLES, 2011).

Contudo, em diversos fóruns do setor, o tema referente à qualidade dos produtos pecuários e a garantia sanitária dos mesmos são colocados como barreiras para que o país se coloque como exportador de produtos pecuários de qualidade superior. Sendo necessário a busca do aumento na produção de carne e leite que garanta um superávit capaz de propiciar ao país a prospecção de novos mercados internacionais, assim como garantir que estes produtos sejam oriundos de rebanhos saudáveis e com baixo aporte de perigos químicos contaminantes (BRITO et al., 2014; MAPA, 2009).

As tecnologias emergentes prometem maior produtividade, mais eficiência e menos poluição, que beneficiem a natureza em altas proporções, a fim de atender as necessidades humanas básicas (LIMA, 2011). Buscando a viabilidade econômica, social e ambiental dos sistemas pecuários brasileiros, a procura por novas moléculas eficientes para o controle das parasitoses de interesse pecuário mostra-se alinhada as diretrizes da produção de alimentos seguros, uma vez que possibilitarão um menor número de tratamentos, diminuindo os riscos de contaminação por resíduos metabólicos dos fármacos nos alimentos de origem animal (BRITO et al., 2014; BRITO et al., 2009).

Nesse contexto, o desenvolvimento de tecnologias que propiciem a sustentabilidade da bovinocultura no estado de Rondônia, vem sendo direcionados para estabelecimento de protocolos para o controle do carrapato, *Rhipicephalus microplus* e a mosca-do-chifre, *Haematobia irritans*, principais ectoparasitas que acometem os bovinos no desenvolvimento ponderal da produtividade dos rebanhos e no desenvolvimento da pecuária leiteira em Rondônia (BRITO et al., 2009; BRITO et al., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Rondônia, em Porto Velho.

4.1 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES E PRODUÇÃO DOS EXPLANTES

As sementes de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli foram adquiridas no comércio local de Porto Velho/RO. Em câmara de fluxo laminar foram submetidas a uma desinfestação, sendo submersas em álcool 70% (v/v) por 1 minuto, depois em hipoclorito de sódio 2,0% (v/v) por 20 minutos, e em seguida enxaguadas três vezes com água destilada estéril. Em seguida, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar, sem adição de reguladores de crescimento, pH foi ajustado para 5,8±0,1 antes da autoclavagem (a 120°C e 1 atm, durante 20 minutos). Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C.

Aos 35 dias de cultivo, as plântulas apresentaram um tamanho médio de 6 cm. Em câmara de fluxo laminar foram retirados os explantes foliares e reduzidos a segmentos de 1,0 cm² em placas de Petri esterilizadas.

4.2 INDUÇÃO DE CALOS

Os explantes foliares foram inoculados individualmente em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS, acrescido dos reguladores de crescimento 2,4-D (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), em combinações fatoriais, totalizando vinte cinco tratamentos, dispostos em um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada repetição composta por três explantes. O experimento foi mantido em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C.

A cada sete dias, por um período de 42 dias foi observada a formação de calos. Aos 49 dias de cultivo, avaliou-se a porcentagem de indução de calos (%IC); o percentual da área foliar coberta por células de calos (%AFCC), utilizando o método de observação visual descrito por Mendonça et al. (2013), que atribuem notas para a porcentagem de área coberta por células de calos: 0 = 0%, 1 = 25%, 2 = 50%, 3 = 75% e 4 = 100%; e a massa fresca dos

explantos, os quais foram cuidadosamente limpos com papel toalha para retirar o excesso de meio de cultura e pesados individualmente em balança de analítica com precisão de 0,0001 g. Os dados referentes à %IC, %AFCC e peso da massa fresca, foram submetidos ao teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa Assistat 7.5.

Após avaliação dos resultados, seguindo a metodologia descrita anteriormente, foi realizado um refinamento experimental, no qual os explantes foram inoculados em meio contendo 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e avaliados quanto ao seu peso fresco após 49 dias. Os dados obtidos, assim como as concentrações de 2,4-D na ausência de BAP, foram submetidos à análise de regressão, utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

4.3 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

Explantos foliares foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio MS suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 6,0 g L⁻¹ de ágar, e acrescido da concentração que apresentou maior eficiência na indução e proliferação de calos, 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Os explantes foram mantidos em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C. As avaliações do desenvolvimento dos calos foram realizadas nos 70 dias subsequentes, em intervalos de sete dias. Em cada avaliação, três calos foram pesados, conforme descrito anteriormente. A partir dos dados obtidos, utilizando o programa Microsoft Excel 2010, foi determinada uma curva de crescimento e a equação polinomial de terceira ordem correspondente. Com esta equação, foram obtidos os pesos estimados para cada um dos 70 dias, e em seguida obteve-se as diferenças de pesos entre os dias subsequentes (Apêndice 1). As fases de crescimento dos calos foram determinadas utilizando o seguinte critério:

- a- Fase lag: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são menores ou igual à zero.
- b- Fase exponencial: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são crescente.
- c- Fase linear: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são estáveis.
- d- Fase de desaceleração: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são decrescentes.

- e- Fase estacionária: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes tendem a zero.
- f- Fase de declínio: quando as diferenças entre os pesos dos dias considerados e dos dias subsequentes são negativas.

4.4 CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

Os calos friáveis obtidos foram subcultivados em pequenos frascos de Erlenmeyer contendo 5 ml de meio de cultura MS líquido, suplementado com 30,0 g L⁻¹ de sacarose e acrescido da concentração que apresentou maior eficiência na indução e proliferação de calos, 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, inoculando-se 50 mg de massa celular fresca em cada frasco. As suspensões celulares foram mantidas em agitação (30 rpm) em sala de crescimento sob fotoperíodo de 16 horas, a 26±1°C.

A cada três dias, por um período de quinze dias, foram coletados três frascos para determinação do peso fresco das células, que foram isoladas do meio de cultura por meio de filtração a vácuo em membranas de nylon com porosidade de 0,2 µm. A partir dos dados obtidos, utilizando o programa Microsoft Excel 2010, foi determinada uma curva de crescimento e a equação polinomial de terceira ordem correspondente. Com esta equação, foram obtidos os pesos estimados para cada um dos 15 dias, e em seguida obteve-se as diferenças de pesos entre os dias subsequentes (Apêndice 2). Esse procedimento permitiu a identificação das fases de crescimento das células, com foco na fase estacionária, quando a produção de metabólitos secundários na suspensão atinge o máximo. As fases de crescimento dos calos foram determinadas utilizando o mesmo critério da curva de crescimento dos calos.

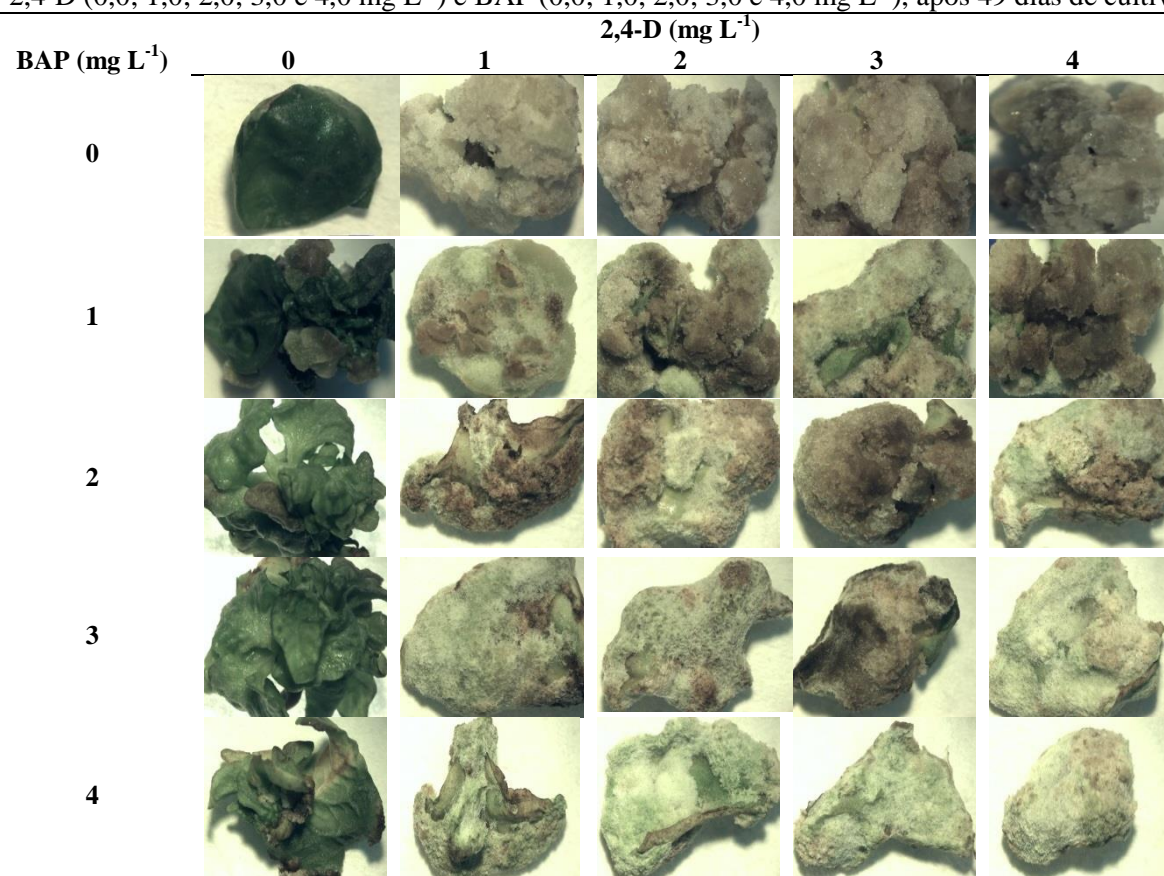
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 INDUÇÃO DE CALOS

A formação de calos iniciou aos sete dias de cultura, com o intumescimento dos explantes. Com 21 dias, a formação de calos foi observada em todas as combinações, exceto no controle experimental (ausência de reguladores). Entretanto, nos tratamentos suplementados com 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹ de BAP isoladamente, a calogênese foi inferior a 60%.

Na Figura 2 estão apresentados os aspectos gerais dos explantes após 49 dias de cultivo. É possível observar ausência de calos no tratamento onde não houve suplementação com reguladores de crescimento; organogênese (formação de brotações) nos tratamentos onde houve suplementação de BAP isoladamente, em todas as concentrações; e proliferação de células de calos nos demais tratamentos.

Figura 2 - Explantes foliares de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 49 dias de cultivo.



Base do retângulo equivalente a 150 mm. Fonte: Produção da autora

Neste trabalho foi observado que o 2,4-D isoladamente ou em combinação com o BAP foi satisfatório para a indução de calos em explantes foliares de *C. frutescens*, resultando em 100% de indução, em todas as combinações. Farias-Filho (2006) cita o 2,4-D como essencial para regeneração de calos a partir de anteras de pimenta, proporcionando altas taxas de produção de calos. Segundo Taiz & Zeiger (2013), a formação de calos tem sido obtida de forma considerável através da auxina 2,4-D isoladamente, ou em combinação com a citocinina BAP. Forket et al. (2013) afirmam que o 2,4-D é uma auxina sintética que auxilia no desenvolvimento do calo e as citocininas, com o auxílio das auxinas, são propulsoras da divisão celular.

Khan et al. (2011) ao avaliarem a influência da combinação de 2,4-D e BAP na indução de calos em explantes internodais de *Capsicum annuum* L. cv Pusa Jwala., observaram que a maior proliferação de células de calo ocorreu na presença dos dois reguladores de crescimento, obtendo melhores respostas nas concentrações de 2,21 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,4 mg L⁻¹ de BAP. Kittipongpatana et al. (2007) observaram em explantes foliares de *C. annuum* L., efeito positivo de 2,4-D, isoladamente (1,0 mg L⁻¹) ou em associação com o BAP (1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 0,1 mg L⁻¹ BAP). Por outro lado, BAP isoladamente não resultou na formação de calos em explantes de *Vigna unguiculata* L. (OLIVEIRA et al., 2007).

Os tratamentos suplementados apenas com BAP resultaram em brotações em 30% dos explantes. Otroshy et al. (2011) também observaram a presença de brotações quando utilizou 2,0 mg L⁻¹ de BAP isoladamente em explantes nodais de *C. annuum*. Já Verma et al. (2013) visando a regeneração de *C. annuum* L. cv. California Wonder., obtiveram resultados mais eficientes na combinação de 6,0 mg L⁻¹ de BAP + 0,3 mg L⁻¹ de AIA. Em geral, a presença de uma citocinina é essencial para a produção de brotos. Grattapaglia & Machado (1998) afirmam que para brotações as concentrações de citocinina isolada são satisfatórias.

Em relação ao aspecto dos calos, a utilização de 2,4-D isoladamente em todas as concentrações resultaram em calos brancos e friáveis. Porém, quando combinado com BAP, ocorreu a formação de calos com aspecto friável e compacto, e quando se utilizou BAP isoladamente ocorreu a proliferação de calos compactos. Resultados contrários foram obtidos por Santos et al. (2014), que ao utilizarem BAP isoladamente, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 4,0 mg L⁻¹, obtiveram calos brancos e friáveis.

Mangang (2014) ao testar o efeito da combinação de auxina e citocinina em tecidos placentários de frutos de *C. chinense* Jacq. cv. Umorok., obteve melhor resposta de

proliferação de calos friáveis com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D + $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN. Umamaheswari & Lalitha (2007) em um experimento com explantes foliares de *C. annuum* L. obtiveram resposta convergente nessas mesmas concentrações.

Segundo George et al. (2008a), a textura e morfologia do calo, manipulada pelas variações nos constituintes do meio nutritivo, produz calos macios, friáveis e úmidos em meio de alta concentração de auxina e baixa de citocinina, e se a relação é inversa, produz calos de tecido compacto seco e com células pequenas.

De acordo com Flores (2006), os calos com diferentes taxas de crescimento e níveis de diferenciação (friáveis e compactos) podem diferir na capacidade de sintetizar compostos bioativos. A friabilidade é importante para cultivos de células em suspensão, pois as células desintegram-se quando manipulados e se dividem facilmente no meio de cultura, acelerando a multiplicação celular. Para *C. frutescens* cv. Stromboli os tratamentos que foram mais eficientes para a obtenção de calos friáveis foram os suplementados apenas com 2,4-D.

5.2 ÁREA FOLIAR COBERTA POR CÉLULAS DE CALOS

Em relação à área foliar coberta por células de calo (AFCC), as maiores médias foram observadas no tratamento suplementado com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D e no tratamento com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP + $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D; nestes tratamentos todos os explantes apresentaram 100% da AFCC, resultando em nota 4,00 (Tabela 1).

Tabela 1—Médias da área foliar coberta por células de calo (AFCC) em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e $4,0 \text{ mg L}^{-1}$), após 49 dias de cultivo.

BAP (mg L^{-1})	2,4-D (mg L^{-1})				
	0	1	2	3	4
0	0,00 cB	4,00 aA	3,83 aA	3,78 aA	3,67 aA
1	1,89 aC	3,33 bB	3,67 aAB	3,78 aAB	4,00 aA
2	1,55 aC	3,22 bB	3,66 aAB	3,77 aA	3,89 aA
3	1,00 bB	3,44 bA	3,55 aA	3,61 aA	3,78 aA
4	1,00 bB	3,55 abA	3,78 aA	3,72 aA	3,55 aA

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As áreas cobertas por calos foram significativamente maiores quando os explantes foram inoculados na presença de 2,4-D, evidenciando que a presença desta auxina é essencial no processo de calogênese. O mesmo foi observado por Guimarães (2015), trabalhando com explantes foliares de *Piper permucronatum*.

Como a indução de calo é dependente de um balanço hormonal relativamente equilibrado de auxinas e citocininas (PINHAL et al., 2011), no caso da Stromboli, provavelmente, o fornecimento da auxina na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ no meio de cultura foi suficiente para balancear o conteúdo endógeno de citocininas do explante. Vale ressaltar que a adição de 2,4-D numa concentração quatro vezes maior ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi necessária para proporcionar resposta semelhante quando na presença de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

Assim, os resultados indicam que a citocinina (BAP) utilizada isoladamente no meio de cultivo, juntamente com as citocininas endógenas do segmento foliar, possivelmente proporcionaram uma elevada concentração deste regulador em relação às auxinas endógenas, ocasionando uma diminuição na formação de calo. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Nogueira et al. (2007). Estes autores também obtiveram as maiores porcentagens de área do explante coberta por células de calos (90%) com a concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D em *Byrsonima intermedia* A. Juss. Da mesma forma, Soares (2003), verificou que explantes de segmentos foliares de ingazeiro (*Inga vera* Willd.) apresentam maior porcentagem de formação de calos e da área do explante coberta por calos na presença de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D.

Torres et al. (1998), citam que o regulador vegetal 2,4-D apresenta caráter indutor para o intumescimento e calosidade. Segundo Nogueira et al. (2007), o 2,4-D é eficiente na formação calogênica, pois expressa efeito no metabolismo do RNA, induzindo a transcrição de RNAs mensageiros capazes de decodificar proteínas para o crescimento e que podem induzir a proliferação desordenada.

Santos et al. (2014), obtiveram maiores porcentagens da AFCC nos tratamentos suplementados com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ou $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP em explantes de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis., onde todos os explantes apresentaram entre 75 e 100% da AFCC. Já Cerqueira et al. (2002), trabalhando com a indução de calos em segmentos foliares de erva-de-touro (*Tridax procumbens* Linn) verificaram efeito significativo da combinação de auxina e citocinina, obtendo 100% de área coberta com calos em meio acrescido com $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP.

5.3 MASSA FRESCA

Quanto à massa fresca dos explantes, os maiores valores foram observados nos tratamentos contendo apenas 2,4-D (Tabela 2). Esta auxina é frequentemente usada na indução de calogênese e, no caso da Stromboli, explantes foliares responderam positivamente à sua presença.

Tabela 2- Médias do peso da massa fresca (g) de calos em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 49 dias de cultivo.

BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)				
	0	1	2	3	4
0	0,0338 bD	1,1589 aA	0,9457 aB	0,7884 aBC	0,7207 aC
1	0,4463 aB	0,5031 bAB	0,6869 bA	0,6712 abA	0,6406 aAB
2	0,3131 aC	0,3525 bcBC	0,5296 bAB	0,5513 bcA	0,3536 bBC
3	0,2899 aB	0,3483 bcAB	0,4910 bcA	0,3928 cdAB	0,3076 bAB
4	0,2579 aA	0,2597 cA	0,3048 cA	0,2474 dA	0,2308 bA

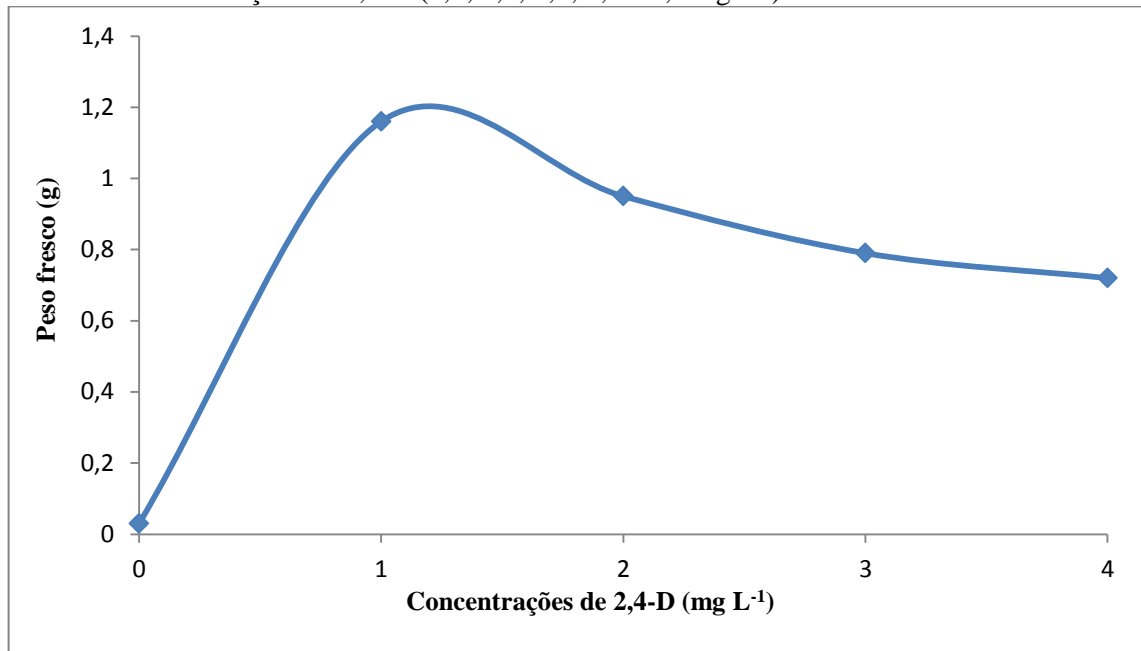
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si dentro da mesma linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si dentro da mesma coluna, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O uso isolado do 2,4-D também proporcionou maior peso fresco dos calos obtidos em segmentos foliares de *Croton urucurana* Baill (LIMA et al., 2008). Já Santos et al. (2014) observaram o maior peso fresco dos calos formados em segmentos foliares de *Cissus verticillata* nos tratamentos contendo apenas BAP.

Na Figura 3 é possível observar que a concentração que resultaria em maior massa fresca dos calos estaria entre 1,0 e 2,0 de mg L⁻¹ de 2,4-D. Esses resultados também confirmam os obtidos por Palú (2004) onde o aumento da produção de calos ocorreu até a concentração de 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, e a partir desta houve inibição na produção de calos.

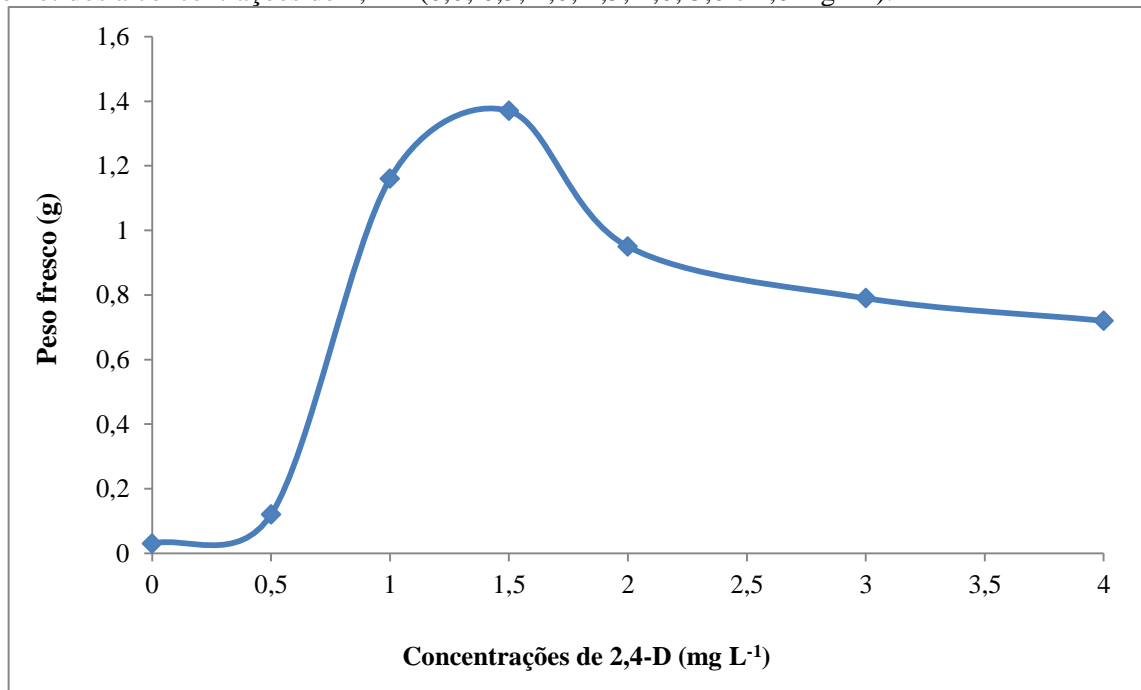
Segundo Nogueira et al. (2007) as auxinas são capazes de iniciar a divisão celular e controlar os processos de crescimento e alongação celular. Sendo assim, foi realizado um novo experimento para o refinamento dos dados, utilizando concentrações intermediárias, cujo resultado pode ser observado na Figura 4.

Figura 3- Médias do peso da massa fresca (g) de calos em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a concentrações de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹).



Na Figura 4 é possível observar que a concentração de 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D no meio de cultura reagiu positivamente com a citocinina endógena do explante foliar, já que esse balanço hormonal resultou em maior peso fresco de calos (1,37 g).

Figura 4- Médias do peso da massa fresca (g) de calos em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a concentrações de 2,4-D (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹).



Os resultados deste trabalho são semelhantes aos obtidos por Nogueira et al. (2007), Santos et al. (2005), Soares (2003), Bonilla (2002) e Conceição (2000) trabalhando com segmentos foliares de *Byrsonima intermedia* A. Juss., *Salix humboldtiana* Willd., *Inga vera* Willd., *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth. e *Derris urucu* (Killip & Smith), respectivamente. Os mesmos observaram que as citocininas exógenas nem sempre são necessárias e que muitos tecidos desenvolvem-se *in vitro* apenas com suprimento de auxinas.

Pereira et al. (2007) testaram o efeito de diferentes concentrações e tipos de auxina (2,4-D, Picloram, ANA e AIB) nas concentrações 0,0; 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹, em explantes foliares de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL., e constataram o efeito positivo dessas auxinas. Segundo Taiz & Zeiger (2009) estas são indispensáveis ao desenvolvimento de calos, uma vez que são responsáveis pelo início da divisão celular e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular.

Ferreira et al. (2007) ao inocularem segmentos foliares de figueira cultivar Roxo de Valinhos (*Ficus carica* L.) obtiveram maior massa fresca de calos utilizando 2,4-D na concentração de 2,0 mg L⁻¹. Resultados similares foram obtidos por Magalhães et al. (2006) em um trabalho com genótipos de batata-doce (*Ipomoea batatas*).

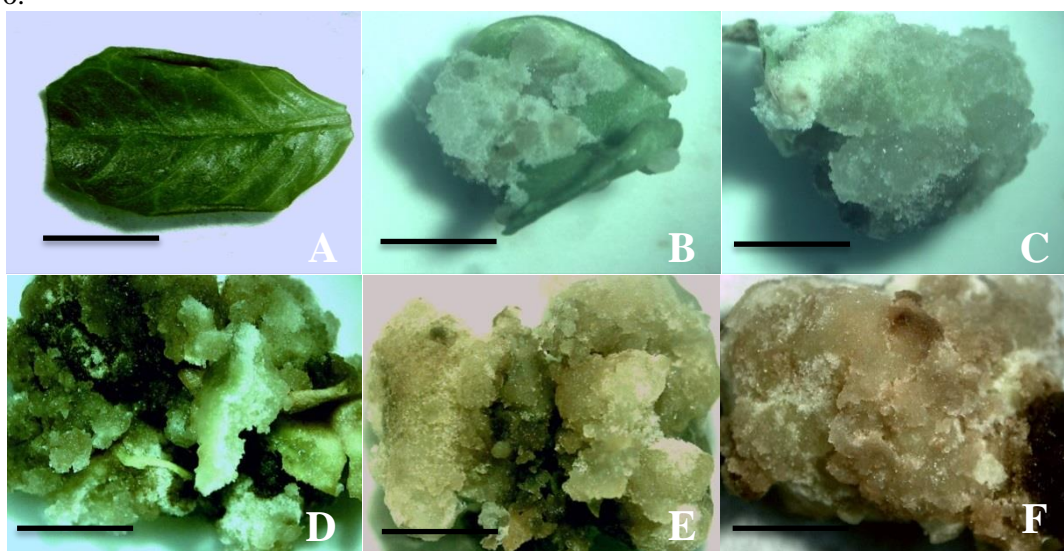
Lima et al. (2008) também obtiveram resultados satisfatórios, trabalhando com indução de calos em segmentos foliares *Croton urucurana* Baill., onde o uso isolado de 2,4-D proporcionou o maior peso fresco dos calos obtidos. Já Santos et al. (2014) em um trabalho com explantes foliares de *Cissus verticillata*, observaram maiores valores nos tratamentos contendo apenas BAP. Balbuena et al. (2009) obtiveram resultados satisfatório ao submeter explantes foliares de *Piper solmsianum* em um meio suplementado 0,2 mg L⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg L⁻¹ de BAP, indicando a necessidade da relação auxina/citocinina no aumento de matéria fresca de calos.

5.4 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

A Figura 5 mostra os aspectos da formação de calos friáveis em segmentos foliares de *C. frutescens* cv. Stromboli em meio MS suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D, desde a inoculação até 70 dias de cultivo. Aos 14 dias é possível observar a indução de calos no segmento foliar, representando mais de 50% da área do explante coberta por células de calos (Figura 5B). Aos 28 dias de cultivo, observou-se grande proliferação de células de calos friáveis, cobrindo todo explante foliar (Figura 5C). É possível observar aos 42 dias de cultivo

um aumento de volume das células de calos (Figura 5D). Aos 56 dias o tamanho das células permaneceu constante (Figura 5E). Aos 70 dias os calos iniciaram um processo de degradação, apresentando escurecimento da massa e do meio de cultura (Figura 5F).

Figura 5- Calos de *C. frutescens* cv. Stromboli inoculados em meio MS suplementado com 2,4-D ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) A – 1º dia de cultivo; B – 14 dias; C – 28 dias; D – 42 dias; E - 56 dias e F – 70 dias de cultivo.



Barra = 5,0 mm. Fonte: Produção da autora.

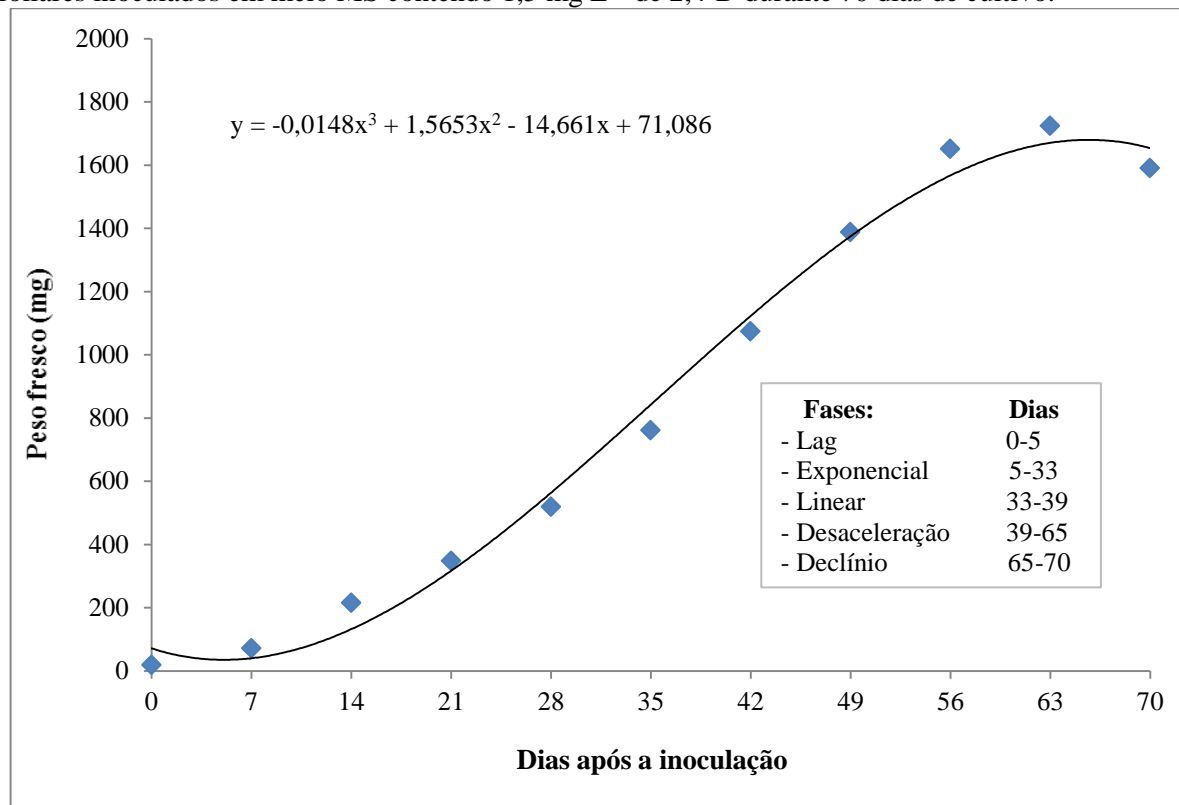
No processo de crescimento de calos é importante a determinação da sua curva de crescimento para identificação das diferentes fases e a determinação do momento ideal de repicagem ou utilização em suspensões celulares, visando a otimização da produção de metabólitos (GEORGE et al., 2008a; SOARES, 2003).

As células individuais ou órgãos tendem a apresentar um crescimento ilimitado, que obedece a um padrão exponencial. Em geral, volume, massa ou superfície, altura, número de células ou mesmo conteúdo de proteína, mostram padrão sigmoide devido às interações mútuas entre indivíduos que infligem limitações ao crescimento, fazendo com que a curva sofra uma inflexão, e os organismos tendem a desenvolver uma conformação sigmoide, devido a eventuais limitações de espaço e/ou nutrientes ou acúmulo de produto final (PEIXOTO et al., 2011).

Neste trabalho, o crescimento dos calos seguiu uma curva do tipo sigmoide, com cinco fases distintas: lag, exponencial, linear, desaceleração e de declínio, com duração de 70 dias de cultivo (Figura 6). Santos et al. (2016) e Nogueira et al. (2008) também observaram um padrão sigmoide, porém com seis fases (lag, exponencial, linear, desaceleração, estacionária e de declínio) na curva de crescimento de calos foliares de *Piper permucronatum* e de

Byrsonima intermedia A. Juss, respectivamente. Já em *Coffea arábica* cv. Rubi foram identificadas somente três fases (lag, exponencial e linear), devido a baixa velocidade de crescimento de calos que essa espécie apresenta (SANTOS et al., 2003).

Figura 6- Curva de crescimento de calos de *C. frutescens* cv. Stromboli obtidos a partir de segmentos foliares inoculados em meio MS contendo 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 70 dias de cultivo.



A fase *lag*, na qual células do explante preparam-se para divisão celular, acumulando biomassa (CASTRO et al., 2008), ocorreu até o 5º dia após a inoculação. Valle (2003) avaliando o crescimento de calos obtidos em segmentos foliares de pimenta longa (*Piper hispidinervum*) observou a fase lag em torno de 10 dias de cultivo. Souza et al. (2015) observaram essa fase na curva de crescimento de explantes foliares de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Iberaba Jalapeño, do dia da inoculação até o 12º de cultivo. Já em *Piper permucronatum* essa fase foi mais longa, ocorrendo até o 21º dia após a inoculação (SANTOS et al., 2016). Segundo Scragg & Allan (1993), a fase lag pode ser considerada como produtora de energia.

A fase de crescimento *exponencial* ocorreu entre o 5º e o 33º dia de cultivo, período esse caracterizado pela máxima divisão celular (SANTOS et al., 2010). Em calos de segmentos foliares de pequi (Caryocar brasiliense Camb.), essa fase também durou

cerca de 28 dias, ocorrendo entre o 7º e o 35º dia de cultivo (LANDA et al., 2000). Em *Coffea arabica* esse período estendeu por cerca de 35 dias, entre o 42º e o 77º dias de cultivo (SANTOS et al., 2003). Em murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) essa fase foi mais curta, com duração de 20 dias, ocorrendo entre 20º a 40º dias de cultivo (NOGUEIRA et al., 2008).

A fase *linear* foi observada entre o 33º e o 39º dia de cultivo. Esta fase é caracterizada pela diminuição da divisão celular e aumento do volume das células. Soares (2003), estudando a curva de crescimento de calos induzidos em explantes foliares de ingá (*Inga vera*), observou a ocorrência da fase linear entre o 30º e o 60º dia após a inoculação. Já em calos foliares de *Jatropha curcas* L., a fase linear foi mais curta, de 40 a 45 dias após a inoculação (FEITOSA et al., 2013). Entretanto, em sangra d'água (*Croton urucurana*) essa fase ocorreu somente entre o 70º e 98º dias de cultivo (LIMA et al., 2007).

A fase de *desaceleração* ocorreu entre o 39º e o 65º dia. Entretanto, Azevedo (2003), em seu trabalho com copaíba, verificou que essa fase ocorreu entre o 126º e o 154º dia após a inoculação. A literatura menciona que neste período ocorre redução na divisão celular, causada pelo déficit de nutrientes no meio, secagem do ágar e acúmulo de substâncias tóxicas, sendo o período ideal para a repicagem dos calos (FEITOSA et al., 2013). Landa et al. (2000) verificou que para calos obtidos de segmentos foliares de pequi, a transferência para novo meio de cultura deve ocorrer entre o 46º e o 49º dia de cultivo.

A partir do 65º dia, a cultura entrou em fase de *declínio*. Nessa fase os calos iniciaram um processo de degradação, apresentando escurecimento da massa e do meio. Além da perda de peso devido à morte celular (CASTRO et al., 2008). Na curva de crescimento de calos de explantes foliares de *Capsicum annuum*, a fase de declínio deu-se do 36º ao 42º dias de cultivo (SOUZA et al., 2015). Ciclos mais longos em geral são observados em outras espécies e gêneros. Como por exemplo, em murici-pequeno esta fase ocorreu a partir do 100º dia de cultivo (NOGUEIRA et al., 2008).

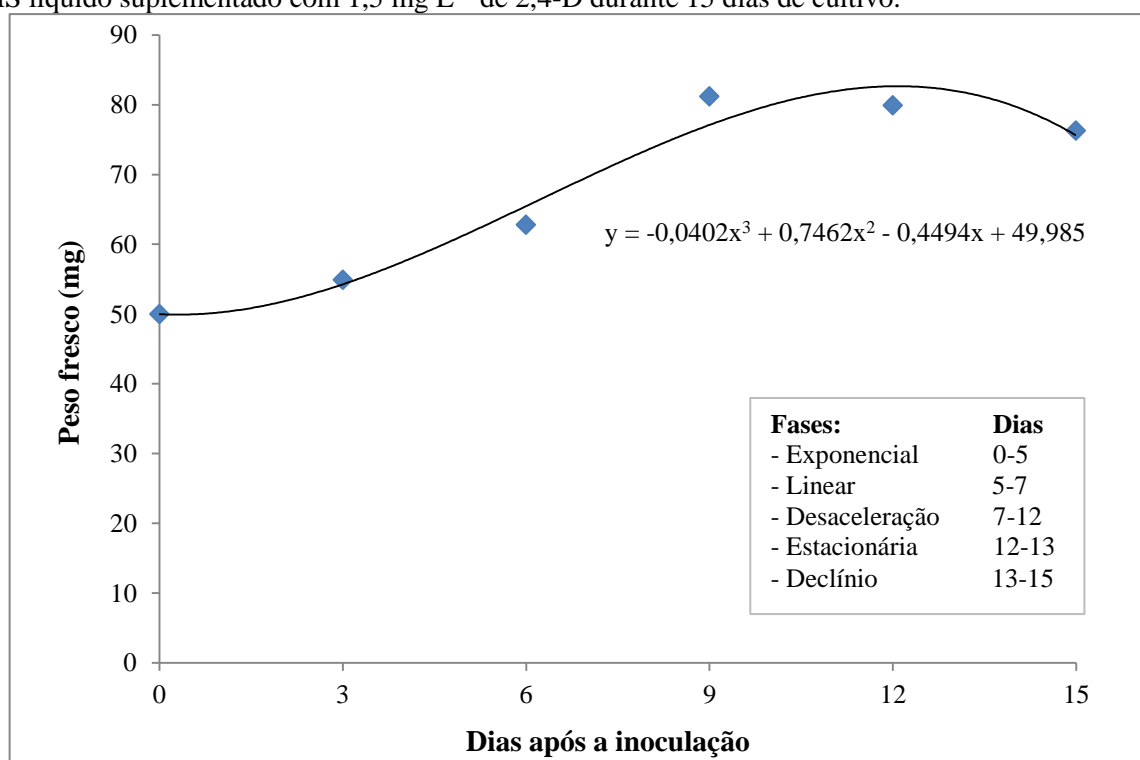
5.5 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS EM SUSPENSÃO

O crescimento de células em suspensão seguiu o padrão sigmoide, apresentando as seguintes fases: exponencial, linear, desaceleração, estacionária e declínio (Figura 7). Em suspensões de *Cordia verbenacea* foram identificados cinco estágios de crescimento: as fases lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária (LAMEIRA et al., 2009).

As suspensões celulares exibem maior taxa de divisão celular, permitindo um crescimento mais acelerado devido ao contato direto das células com os nutrientes do meio (LOYOLA-VARGAS & VASQUEZ-FLOTA, 2006).

O período de máxima divisão celular ou período de crescimento *exponencial* ocorreu até o 5º dia de cultivo. Petersen (2006) obteve resultados similares em células de calos de *Catharanthus roseus*. Em *Piper permucronatum* esse período de crescimento ocorreu entre o 3º e o 6º dia (GUIMARÃES, 2015).

Figura 7- Curva de crescimento de células em suspensão em função da duração da cultura no meio MS líquido suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D durante 15 dias de cultivo.



A fase *linear* ocorreu entre o 5º e o 7º dia de cultivo. Em suspensões celulares de *Piper permucronatum* esse período de crescimento ocorreu entre o 6º e o 9º dia (GUIMARÃES, 2015). Em células de *Cordia verbenacea* essa fase foi mais longa, ocorrendo entre o 12º e o 24º dia (LAMEIRA et al., 2009). Nesse período, a divisão celular diminui e as células crescem (SMITH, 2012).

Entre o 7º e o 12º dia de cultivo as células entraram na fase de *desaceleração*, na qual ocorre a diminuição no crescimento celular. As culturas nesse período devem ser transferidas para um meio fresco devido à redução de nutrientes, produção de produtos tóxicos e a redução

de O₂ no interior das células. Em suspensões celulares de *Coffea arabica* essa fase ocorreu entre o 20º e 28º dia de cultivo (TORRES, 2013).

A fase *estacionária*, onde há um maior número de células com menor capacidade de divisão celular (SMITH, 2012), foi observada do 12º ao 13º dia. Entretanto Balbuena et al. (2009) verificaram essa fase entre o 30º e o 42º dia de cultura em *Piper solmsianum*. Na fase estacionária ocorre o maior acúmulo de metabólitos secundários, porém com menor crescimento celular (LAMEIRA et al., 2009).

A partir do 13º dia, as células iniciaram o processo de degradação, caracterizando a fase de *declínio*. Em suspensões de *P. permucronatum*, esse período estendeu-se do 12º ao 15º dia de cultivo. Ciclos muito mais longos são observados em outras espécies e gêneros (GUIMARÃES, 2015).

Sistemas de células em suspensão oferecem a possibilidade de obtenção de quantidades desejáveis de compostos metabólitos, que poderão vir a substituir ou diminuir o uso de defensivos químicos (SILVA et al., 2007), contribuir para a produção de alimentos mais seguros e proteger o meio ambiente dos efeitos diversos causados pelos defensivos convencionais (SILVA, 2008).

CONCLUSÃO

Para a indução de calos de friáveis de *Capsicum frutescens* cv. Stromboli recomenda-se a utilização de explantes foliares provenientes de plântulas com trinta e cinco dias de cultivo *in vitro*. O meio MS suplementado com 1,5 mg L⁻¹ de 2,4-D resultou em maior porcentagem de indução e proliferação de calos friáveis.

A curva de crescimento dos calos desta espécie apresenta um padrão sigmoide com cinco fases distintas de crescimento: lag, exponencial, linear, desaceleração e de declínio, tendo duração de 70 dias de cultivo. Os dados indicam que o momento adequado para repicagem dos calos é entre o 39º e o 65º dia após a inoculação.

A curva de crescimento de células em suspensão também apresentou um padrão sigmoide com cinco fases: exponencial, linear, desaceleração, estacionária e de declínio. Os dados indicam o período entre o 12º e o 13º dia de cultura para o maior acúmulo de metabólitos secundários (fase estacionária).

Este estudo mostrou a possibilidade de subsidiar trabalhos relacionados à identificação do potencial bioativo de metabólitos secundários de espécies de *capsicum*, com atuação, por exemplo, como método alternativo de controle do carrapato (*Rhipicephalus microplus*) e da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), os quais causam perdas na produção pecuária, especialmente na região Norte.

Com isso, espera-se impactar positivamente a agricultura e a pecuária da região Norte, com a determinação de produtos naturais que possam ser utilizados em substituição aos defensivos químicos atualmente utilizados, garantindo a implementação de práticas para a produção de alimentos seguros, sem causar danos contaminantes ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, n. 3, p. 10-15, 2001.
- ARIKAT, N. A.; JAWAD, F. M.; KARAM, N. S.; SHIBLI, R. A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticulosa* Mill.). **Scientia Horticulturae**, v. 100, n. 1, p. 193-202, 2004.
- ARNALDOS, T. L.; MUÑOZ, R.; FERRER, M.A.; CALDERÓN, A.A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x Ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 315-322, 2001.
- AZEVEDO, K. S. **Indução e análises bioquímicas de calos e aspectos da anatomia foliar de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.)**. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- BALBUENA, T.S.; SANTA-CATARINA, C.; SILVEIRA, V.; KATO, M.J.; FLOH, E.I.S. *In vitro* morphogenesis and cell suspension culture establishment in *Piper solmsianum* C. DC. (Piperaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 274-28, 2009.
- BERG, J. M. T. E.; LUBERT, J. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 545 p.
- BEZERRA, D. A. C. **Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. 2008. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido) - Universidade Federal de Campina Grande, 2008.
- BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaúde, 2007. 110 p.
- BOSLAND, P.W.; VOTAVA, E. J. **Peppers: vegetable and spice *Capsicums***. New York: CABI Publishing, 1999. 204 p.
- BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; MONACHE, G. D. Cultura de células vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 354- 379.
- BRITO, L. G. **Sistema de produção de leite para Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia. 2011. 72 p.
- BRITO, L.G.; BARBIERI, F. DA S.; OLIVEIRA, M. C. DE S.; SILVA, R. R. DA; SILVA, I. F. DA.; SANTOS, A.P.L. DOS; GUERRERO, FELIX. **Avaliação da susceptibilidade de populações da mosca-dos-chifres a pesticidas organofosforados em rebanhos de corte no Estado de Rondônia, Brasil**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2014. 6 p. (Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico, 390).
- BRITO, L. G.; SILVA NETTO, F. G.; BARBIERI, F. da S.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARROS, A. T. de. Epidemiologia, caracterização molecular e controle do carrapato dos bovinos e da mosca-do-chifre em Rondônia. In: SIMPÓSIO EMBRAPA LABEX DE SANIDADE

ANIMAL, 1., 2009, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2009. p. 1-2.

BRITO, L. G.; SILVA NETTO, F. G. ; ROCHA, R. B. **Controle integrado da mosca-do-chifre para a microrregião de Ji-Paraná, Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007. 4 p. (Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico, 327).

BONILLA, M. G. O. **Propagação *in vivo*, indução, curva de crescimento de calo e abordagem fitoquímica em *Rudgea viburnoides* (CHAM) Benth.** 2002. 162 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. L.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, 1998. p. 87-132.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B. **Sistema de produção de pimentas (*Capsicum spp.*)**: Botânica. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. (Sistemas de produção, 4).

CARVALHO, S. I. C. BIANCHETTI, L. B.; BUSTAMANTE, P. G.; SILVA, D. B. **Catálogo de germoplasma de pimentas e pimentões (*Capsicum spp.*) da Embrapa Hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2003. 49 p.

CARVALHO, S. I. C; BIANCHETTI, L. B; RIBEIRO, C. S. C; LOPES, C. A. **Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2006. 27 p. (Documentos, 94).

CASTRO, A. H. F.; LIMA, M. M.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; SÓTER, M. O. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 2, p. 99-104, 2008.

CERQUEIRA, E. S.; PINTO, J. E. B. P.; DE MORAIS, A. R.; DE CASTRO, N. E. A.; CARDOSO, M. D. G.; LAMEIRA, O. A. Indução de calos em erva-de-touro (*Tridax procumbens* L.) utilizando diferentes reguladores de crescimento e tipos de explantes. **Ciência Agrotecnologia**, v. 26, n. 2, p. 301-308, 2002.

CHARLET, S.; GILLET, F., VILLARREAL, M.L.; BARBOTIN, J.N.; FLINIAUX, M.A.; NAVA-SUCEDO, E. Immobilisation of *Solanum chrysotrichum* plant cells with Ca-alginate gel beads to produce an antimycotics pirostanolsaponin. **Plant Physiol Biochem**, v. 38, n. 11, p. 875-870, 2000.

CHATTOPADHYAY, S.; FARKYA, S.; SRIVASTAVA, A. S.; BISARIA, V. S. Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 7, n. 3, p. 138-149, 2007.

CONCEIÇÃO, H. E. O. da. **Cultivo *in vitro*, nutrição mineral e quantificação de rotenóides em timbós (*Derris sp.*)**. 2000. 191 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

COSTA, F. H. da S.; LOUREIRO, T. da S.; PEREIRA, J.E.S. Influência de auxinas e tipos de explantes na indução de calos friáveis em *Piper hispidinervum* C. DC. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 2, p. 269-274, 2008.

COSTA, L.V.; BENTES, J.L.S.; LOPES, M.T.G.; ALVES, S.R.M.; VIANA JÚNIOR, J.M. Caracterização de acessos de pimentas do Amazonas. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 290-298, 2015.

COSTABEBER, J. A.; CAPORAL, F. R. Possibilidades e alternativas do desenvolvimento rural sustentável. In: VELA, H. (Org.): **Agricultura Familiar e Desenvolvimento Rural Sustentável no Mercosul**. Santa Maria: Editora da UFSM/Pallotti, 2003. p.157-194.

CROTEAU, R; KUTCHAN, T.M; LEWIS, N.G. Natural Products (secondary metabolites). In: BUCHANAN B; GRUISSEM W.J. R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1319.

DUTRA, F. L. A. BRANCO, I.G. MADRONA, G.S. HAMINIUK, C.W.I. Avaliação sensorial e influência do tratamento térmico no teor de ácido ascórbico de sorvete de pimenta. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 2, p. 243-251, 2010.

EGGINK, P. M.; MALIEPAARD, C.; TIKUNOV, Y.; HAANSTRA, J. P. W.; BOVY, A.G.; VISSER, R. G. F. A taste of sweet pepper: Volatile and non-volatile chemical composition of fresh sweet pepper (*Capsicum annuum*) in relation to sensory evaluation of taste. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 301-310, 2012.

FARIAS-FILHO, L. P. F. **Calogênese em anteras e diversidade genética de acessos de pimenta (*Capsicum* spp.) do banco de germoplasma da Universidade Federal de Roraima com base em marcador RARPD**. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.

FEITOSA, L. S.; COSTA, A. S. da; ARRIGONI-BLANK, M. F.; DIBAX, R.; BOTÂNICO, M. P.; BLANK, A. F. Indução e análise histológica de calos em explantes foliares de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Biociência Journal**, v. 29, n. 2, p. 370-377, 2013.

FERREIRA, E. A.; PASQUAL M.; REZENDE, J. C. Calogênese em plântulas de figueira. Comunicação. **Revista Ceres**, v. 54, n. 312, p. 112-117, 2007.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2008. 402 p.

FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de B-ecdisona em *Pfaffia glomerata* e *Pfaffiatuberosa* (Amaranthaceae)**. 2006. 168 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FORKET, D.E; KIEBER, J.; HILL, C.C. Citocininas: Reguladores da Divisão celular. In TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 619-646.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de

plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**. Netherlands: Background, 2008a. 501p.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; KLERK, G. J. Plant tissue culture procedure-Background. In _____. **Plant propagation by tissue culture**. 2.ed. Netherlands: Springer, 2008b. p. 1-28.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, n. 4, p. 794-802, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/CNPH, 1998. p. 183-260.

GUIMARÃES, M.C.M. **Estudo da calogênese, dinâmica de crescimento de calos e estabelecimento de suspensões celulares de *Piper permucronatum***. 2015. 43 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

HENZ, G.P.; COSTA, C.S.R. Alternativa rentável: como produzir pimenta. **Revista Cultivar Hortalíça e Fruta**, v.33, p. 7, 2005.

IDARON. Agência de Defesa Sanitária Agrosilvopastoril do Estado de Rondônia. **Levantamento de dados sobre a produção de leite em Rondônia**. Porto Velho, IDARON, 2013. 15p.

KAZEM, M. G. T.; EL-SHEREIF, S. A. E. H. N. Toxic effect of *Capsicum* and *Garlic* xylene extracts in toxicity of boiled linseed oil formulations against some piercing sucking cotton pests. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 8, n. 4, p. 390-396, 2010.

KHAN, H. SIDDIQUE, I.; ANIS, M. KHAN, P.R. *In vitro* organogenesis from internode derived callus cultures of *Capsicum annuum* L. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 84-89, 2011.

KRAIKRUAN, W.; SUKPRAKARN, S.; MONGKOLPORN, O.; WASEE, S. Capsaicin and dihydrocapsaicin contents of Thai chili cultivars. **Kasetsart Journal (Natural Sciences)**, v. 42, n. 4, p. 611- 616, 2008.

KITTIPONGPATANA, N.; MANEERAT, P.; PATTANAKITKOSOL, P.; KITTIPONGPATANA, O.S. Effect of Some Factors on the Growth of *Capsicum annuum* L. Cell Suspension Culture and Biotransformation of Hydroquinone to Arbutin. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2007.

LAMAS, F. M. Estudo comparativo entre cloreto de mepiquat e cloreto de chlormequat aplicados no algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 265-272, 2001.

- LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2009.
- LANDA, F. S. L.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. BUENO FILHO, J. S. S. Indução *in vitro* de calos explantes foliares de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24 (Edição Especial) p. 56-63, 2000.
- LEE, S.M.; KIM, S.Y.; LEE,J.; YU, K.W.; CHANG, I.; SUH, H. J. Nonpungent *Capsicum* fermentation by *Bacillus subtilis* and the addition of Rapidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 257-262, 2008.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, Á. A. N. S. Indução de calos em segmentos foliares de sangra d água (*Croton urucurana* Baill.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 1, p. 17-22, 2008.
- LIMA, E. C.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C. Avaliação bioquímica do desenvolvimento de calos *in vitro* a partir de segmentos foliares de sagra d`água (*Croton urucurana* Baill.). **Magistra**, v. 19, n. 3, p. 184-190, 2007.
- LIMA, R.A. **Aclimatização de mudas micropropagadas de café Conilon (*Coffea canephora* Pierre ex. Froehner)**. 2011. 47 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2011.
- LOYOLA-VARGAS, V.; VASQUEZ-FLOTA, F. **Plant cell culture protocols**. Totowa: Humana, 2006. 416p.
- LUZ, F.J.F. **Caracterização morfológica e molecular de acessos de pimenta (*Capsicum chinense* Jacq.)**. 2007. 70 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- MADAIL, J. C. M.; SCHNEID, L. F.; SIMA, L. F.; WENDT, A. N. **Economia da produção de pimenta vermelha no município de Turuçu-RS**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 27p. (Embrapa Clima Temperado. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 19).
- MADHUMATHY, A. P.; AIVAZI, A.; VIJAYAN, V. A. Larvicidal efficacy of *Capsicum annuum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Jornal of Vector Borne Diseases**, v. 44, n. 1, p. 223-226, 2007.
- MAGALHÃES, J. S.; SANTOS, M. DO D. M. dos; FILHO, F. N DA C.; BLUMER, L.; M. P. GUERRA; TORRES, A.C. Indução de embriogênese somática em genótipos de batata doce. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 79-83, 2006.
- MANGANG, R. J. *In vitro* Callus Induction of Placental Tissues of *Capsicum chinense* Jacq. cv. 'Umorok' using Different Concentrations and Combinations of Growth Hormones. **International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies**, v. 1, n. 8, p. 63-66, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Produção integrada no Brasil:** agropecuária sustentável alimentos seguros / Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 1008 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cultivar web:** Gerenciamento de informação. Disponível em:
<http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php?>. Acesso em: 10 de set. 2016.

MAPELI, A.M.; MOREIRA, M.A.; FINGER, F.L. Fisiologia e conservação pós-colheita das pimentas. In: RÊGO, E. R.; FINGER, F. L.; RÊGO, M. M. **Produção, genética e melhoramento de pimentas (*Capsicum spp.*)**. Paraíba: Areia, 2011. p. 71-85.

MEIRELLES, T. D. S. **Momentos de reflexão para a pecuária de corte 2011**. São Paulo: Conselho Nacional da Pecuária de Corte, Informativo CNPC Ano IX, 2011.

MENDONÇA, E.G.; STEIN, V.C.; BALIEIRO, F. P.; LIMA, C. D. F.; SANTOS, B.R.; PAIVA, L.V. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrobalistic method. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 419-429, 2013.

MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; LOIZZO, M.R.; CONFORTI, F.; STATTI, G.; DE CINDIO, B.; HOUGHTON, P.J.; MENICHINI, F. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum Chinese* Jacq. Cv Habanero. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 553-560, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid grow thandbio-assaywith tobacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, n. 43, p. 473-497, 1962.

MURTHY, H.N.; LEE, E.-J.; PAEK, K.-Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.

NASCIMENTO, P.L.A.; NASCIMENTO, T.C.E.S.; RAMOS, N.S.M.; SILVA, G.R.; GOMES, J.E.G.; FALCÃO, R.E.A.; MOREIRA, K.A.; PORTO, A.L.F.; SILVA, T.M.S. Quantification, antioxidante and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta). **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5434-5447, 2014.

NOGUEIRA, R.C.; PAIVA, R.; LIMA, E C.; SOARES, G.A.; OLIVEIRA, L.M.; SANTOS, B.R.; EMRICH, E.B.; CASTRO, A.H.F. Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 10, n. 1, p. 44-48, 2008.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

OLIVEIRA, A. L.; KIDO, E. A.; ISEPPON, A. M. B; KIDO, L. M. H. Efeito dos Fitorreguladores BAP e 2,4-D Sobre a Indução de Calos em *Vigna unguiculata*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 69-71, 2007.

OLIVEIRA, C. L. L. G. DE. **Vigor vegetativo de clones de café Conilon em condições de campo e seu potencial para propagação *in vitro***. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2011.

OTROSHY, M.; MORADI, K.; KHAYAM NEKOUEI, M. The effect of different cytokinin in propagation of *Capsicum annuum* L. by *in vitro* nodal cutting. **Trakia Journal of Sciences**, v. 9, n. 3, p. 21-30, 2011.

PALÚ, E. G.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. calogênese *in vitro* em anteras de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 736-742, 2004.

PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. F. S. Análise quantitativa do crescimento de plantas: Conceitos e Prática. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n. 13, p. 51-76, 2011.

PEREIRA, C. D.; MELO, B. **Cultura de tecidos vegetais**. Uberlândia: UFU / ICIAG, 2004. 37p.

PEREIRA, R. C. A.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; CORRÊA, R. M.; BERTOLLUCI, S. K. V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J. F. GMEL. (unha de gato). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 3, n. 2, p. 69-77, 2007.

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P. S.; MAAS, C. H.; REBEL, R. A.; GIOTO, C. R.; WENDHAUSEN Jr., R.; LARGURA, G. TAVARES, L. B. B. Biotecnologia de *Piper hispidinervium* pimenta longa. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 15, p. 19-23, 2000.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi-Prensa, 1990. 326 p.

PINHAL, H.F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PINTO, C.M.F.; PINTO, C. L.O; DONZELES, S. M. L. Pimenta *Capsicum*: Propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 3, n. 2, p. 108-120, 2013.

PREECE, J. Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; & DE KLERK, G. (orgs.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 403-422.

RAMACHANDRA RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotecnology Advances**, v. 20, n. 2, p. 101-153, 2002.

RAVEN, P. H; EICKHORN, S. E.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2001. 906p.

REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Capsicum pimentas e pimentões no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/Embrapa Hortaliças, 2000. 113p.

RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A.; CARVALHO, S. I. C.; HENZ, G. P.; REIFSCHNEIDER, F. J. B. **Pimentas Capsicum**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 153p.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; MARTINOTTO, C.; NOGUEIRA, R.C.; PAIVA .P.D. O. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 510-514, 2005.

SANTOS, C. G.; PAIVA, R.; PAIVA, P. D. O; PAIVA, E. Indução e análise bioquímica de calos obtidos de segmentos foliares de *Coffea arabica* L., cultivar RUBI. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 571- 577, 2003.

SANTOS, M. R. A; FERREIRA, M. G. R.; SARUBO, V. Determination of callus growth curve in *conilon coffee*. **Revista Caatinga**, v.23, n.1, p.133-136, 2010.

SANTOS, M. R. A.; GUIMARÃES, M.C.M.; PAZ, E.S.; MAGALHÃES, G.M.O.; SOUZA, C.A.; SMOZINSKI, C.V.; NOGUEIRA, W.O. Induction and growth pattern of callus from *Piper permucronatum* leaves. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 1, p. 142-148, 2016.

SANTOS, M. R. A.; ROCHA, J. F.; PAZ, E.S.; SMOZINSKI, C.V.; NOGUEIRA, W.O.; GUIMARÃES, M.C. M. Callus induction in leaf explants of *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 10, n. 2, p. 41-46, 2014.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, 2000. p. 333-365.

SCRAGG, A. H.; ALLAN, E. J. *Picrasmaquassiioides* Bennet (Japanese quassia tree): *in vitro* culture and production of quassin. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: medicinal and aromatic plants IV**. Berlim: Springer-Verlag, 1993. p. 249-268.

SEPOG (Secretaria de Estado do Planejamento, Orçamento e Gestão). **Produto Interno Bruto (PIB) do estado de Rondônia – 2002 a 2012**, Rondônia, 2014.

SILVA, W. C. **Potencialidade acaricida e estudo fitoquímico de piper aduncum L.(Piperaceae), palicourea marcgravii St. Hil (Rubiaceae) e derris negrensis benth (Fabaceae) sobre rhipicephalus (Boophilus) microplus**. 2008. 167 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2008.

SILVA, W.C.; RIBEIRO, J.D.; SOUZA, H.E.M.; CORRÊA, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion* sp. (Hemiptera:Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta amazônica**, v. 37, n. 2, p. 293-298, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2010. 1102 p.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. Texas: U.S.A. Academic Press, 2012. 208 p.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. D.; NERY, F. C.; VARGAS, D. P.; SILVA, D. R. G. Taxa de multiplicação e efeito residual de diferentes fontes de citocinina no cultivo *in vitro* de *Hancornia speciosa* Gomes. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 152-157, 2011.

SOARES, G.A. **Aspectos do cultivo *in vitro* do ingazeiro (*Inga vera* Willd. Subsp. *Affinis* (DC) T. D. Penn)**. 2003.107 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOUMYA, S.L.; NAIR, B.R. Antifungal efficacy of *Capsicum frutescens* L. extracts against some prevalent fungal strains associated with groundnut storage. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 2, p. 739-750, 2012.

SOUZA, C. A.de.; MAGALHÃES, G.M.O.; SOUZA, P.; PAZ, E.S.; SANTOS, M.R.A.dos. Padrão de crescimento de calos friáveis de folhas, entrenó e nó de *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. iberaba jalapenõ. **X Jornada Científica**, Instituto Federal de Rondônia, 02 a 05 dez/2015. p. 1092-1094.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006. 705p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TOMBOLATO, A. F. C.; COSTA, A. M. M. **Micropropagação de plantas ornamentais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1998. 72 p. (Boletim Técnico).

TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPQ, 1998. 509 p.

TORRES, A. C.; FERREIRA, A. T.; SÁ, F. G.; BUSO, J. A.; CALDAS, L. S.; NASCIMENTO, A. S.; BRÍGIDO, M. M.; ROMANO, E. **Glossário de biotecnologia vegetal**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2000. 128 p.

TORRES, L. F. **Avaliação do potencial embriogênico de suspensões celulares de *Coffea arabica***. 2013.111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

UMAMAHESWARI, A.; LALITHA, V. *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annuum* L. on the callus induction and production of capsaicin. **Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 5, p. 545-551, 2007.

VALLE, R. C. S. C. **Estratégias de cultivo de células de Pimenta longa (*Piper hispidinervium*) e determinação de parâmetros cinéticos**. 2003. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

VANISREE, M.; LEE, C.Y.; LO, S.F.; NALAWADE, S.M.; LIN, C.Y.; TSAY, H.S. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v.45, p.1-22, 2004.

VASCONCELOS, M. A.; GARCIA, M. E. **Fundamentos de economia**. São Paulo: Saraiva 1998. 240 p.

VERMA, S.; DHIMAN, K.; SRIVASTAVA, D. K. Efficient *in vitro* regeneration from cotyledon explants in Bell pepper (*Capsicum annuum* L. cv. California Wonder). **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 4, n. 3, p. 391-396, 2013.

VILLAREAL, M.L.; ARIAS, C.; VEJA, J.; FERIA-VELASCO, A.; RAMIREZ, O.T.; NICASIO, P.; ROJAS, G.; QUINTERO, R. Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* - a plant producing an antifungal spirostanol saponin. **Plant Cell Tiss Organ Culture**, v. 50, n. 1, p. 39-44, 1997.

VINAKAYA, K.S.; NANDINI, K.C.; RAKSHITHA, M.N.; RAMYA, M.; SHRUTHI, J.; SHRUTHI, V.H.; PRASHITH, K.T.R.; RAGHAVENDRA, H.L. Proximate composition, antibacterial and anthelmintic activity of *Capsicum frutescens* (L.) var. Longa (Solanaceae) leaves. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 12, p. 486-491, 2010

VIÑALS, F. N.; GIL ORTEGA, R.; COSTA GARCIA, J. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madrid: Mundi-Prensa, 1996. 607 p.

YAMAMOTO, S.; NAWATA, E. *Capsicum frutescens* L. in southeast and east Asia, and its dispersal routes into Japan. **Economic Botany**, v. 59, n. 1, p. 18-28, 2005.

WAGNER, C. M. **Variabilidade e base genética de pungência e caracteres do fruto: implicações no melhoramento de uma população de *Capsicum annuum* L.** 2003. 104 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phitochemistry**. New York: Chromatographic Science Series, 2008. 896p.

WITT, D. **The chile pepper encyclopedia**. New York: William Morrow and Company, 1999. 337p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Cálculos e valores utilizados para a determinação das fases da curva de crescimento de calos de *C. frutescens* cv. Stromboli.

DIAS APÓS INOCULAÇÃO	PESOS FRESCOS (mg)	¹ PESOS INFERIDOS	² d(i+1) – d(i)	FASES
0	18	71,086	-13,1105	Lag
1		57,9755	-10,0687	Lag
2		47,9068	-7,1157	Lag
3		40,7911	-4,2515	Lag
4		36,5396	-1,4761	Lag
5		35,0635	1,2105	Exponencial
6		36,274	3,8083	Exponencial
7	71	40,0823	6,3173	Exponencial
8		46,3996	8,7375	Exponencial
9		55,1371	11,0689	Exponencial
10		66,206	13,3115	Exponencial
11		79,5175	15,4653	Exponencial
12		94,9828	17,5303	Exponencial
13		112,5131	19,5065	Exponencial
14	214,3	132,0196	21,3939	Exponencial
15		153,4135	23,1925	Exponencial
16		176,606	24,9023	Exponencial
17		201,5083	26,5233	Exponencial
18		228,0316	28,0555	Exponencial
19		256,0871	29,4989	Exponencial
20		285,586	30,8535	Exponencial
21	347,8	316,4395	32,1193	Exponencial
22		348,5588	33,2963	Exponencial
23		381,8551	34,3845	Exponencial
24		416,2396	35,3839	Exponencial
25		451,6235	36,2945	Exponencial
26		487,918	37,1163	Exponencial
27		525,0343	37,8493	Exponencial
28	518,7	562,8836	38,4935	Exponencial
29		601,3771	39,0489	Exponencial
30		640,426	39,5155	Exponencial
31		679,9415	39,8933	Exponencial
32		719,8348	40,1823	Exponencial
33		760,0171	40,3825	Linear
34		800,3996	40,4939	Linear
35	760,9	840,8935	40,5165	Linear
36		881,41	40,4503	Linear
37		921,8603	40,2953	Linear
38		962,1556	40,0515	Linear
39		1002,207	39,7189	Desaceleração
40		1041,926	39,2975	Desaceleração
41		1081,224	38,7873	Desaceleração
42	1073,5	1120,011	38,1883	Desaceleração
43		1158,199	37,5005	Desaceleração
44		1195,7	36,7239	Desaceleração
45		1232,424	35,8585	Desaceleração
46		1268,282	34,9043	Desaceleração

47		1303,186	33,8613	Desaceleração
48		1337,048	32,7295	Desaceleração
49	1388,2	1369,777	31,5089	Desaceleração
50		1401,286	30,1995	Desaceleração
51		1431,486	28,8013	Desaceleração
52		1460,287	27,3143	Desaceleração
53		1487,601	25,7385	Desaceleração
54		1513,34	24,0739	Desaceleração
55		1537,414	22,3205	Desaceleração
56	1651	1559,734	20,4783	Desaceleração
57		1580,212	18,5473	Desaceleração
58		1598,76	16,5275	Desaceleração
59		1615,287	14,4189	Desaceleração
60		1629,706	12,2215	Desaceleração
61		1641,928	9,9353	Desaceleração
62		1651,863	7,5603	Desaceleração
63	1724,3	1659,423	5,0965	Desaceleração
64		1664,52	2,5439	Desaceleração
65		1667,064	-0,0975	Declínio
66		1666,966	-2,8277	Declínio
67		1664,138	-5,6467	Declínio
68		1658,492	-8,5545	Declínio
69		1649,937	-11,5511	Declínio
70	1590,4	1638,386		Declínio

¹ Valores obtidos a partir da equação da reta ($y = -0,0148x^3 + 1,5653x^2 - 14,661x + 71,086$).

² Diferenças entre os pesos do dia considerado e do dia subsequente.

APÊNDICE 2 - Cálculos e valores utilizados para a determinação das fases da curva de crescimento de suspensões de *C. frutescens* cv. Stromboli.

DIAS APÓS INOCULAÇÃO	PESOS FRESCOS (mg)	¹ PESOS INFERIDOS	² d(i+1) – d(i)	FASES
0	50	49,985	1,16	Exponencial
1		51,1404	2,41	Exponencial
2		53,547	3,42	Exponencial
3	54,9	56,9636	4,19	Exponencial
4		61,149	4,71	Exponencial
5		65,862	5,00	Linear
6	62,8	70,8614	5,04	Linear
7		75,906	4,85	Desaceleração
8		80,7546	4,41	Desaceleração
9	81,2	85,166	3,73	Desaceleração
10		88,899	2,81	Desaceleração
11		91,7124	1,65	Desaceleração
12	79,9	93,365	0,25	Estacionária
13		93,6156	-1,39	Declínio
14		92,223	-3,28	Declínio
15	76,3	88,946		

¹ Valores obtidos a partir da equação da reta ($y = -0,0402x^3 + 0,7462x^2 - 0,4494x + 49,985$).

² Diferenças entre os pesos do dia considerado e do dia subsequente.

APÊNDICE 3 - Análise de variância referente a Tabela 1 - Médias da área foliar coberta por células de calo (AFCC) em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 49 dias de cultivo.

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
2,4-D(F1)	4	0.79702	0.19926	3.8812 **
BAP (F2)	4	81.25710	20.31428	395.6915 **
Int. F1xF2	16	7.04174	0.44011	8.5727 **
Tratamentos	24	89.09586	3.71233	72.3106 **
Resíduo	50	2.56693	0.05134	
Total	74	91.66279		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	50	3.7207	3.8812	0.008
4	50	3.7207	395.6915	<.0001
16	50	2.3816	8.5727	<.0001
24	50	2.1844	72.3106	<.0001

Fator 1 = 2,4-D

Fator 2 = BAP

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1 (2,4-D)

1	3.05667 b
2	3.33467 a
3	3.22267 ab
4	3.07800 b
5	3.12333 ab

dms = 0.23425

Médias do fator 2 (BAP)

1	1.08933 c
2	3.51133 b
3	3.70133 ab
4	3.73400 ab
5	3.77933 a

$$dms = 0.23425$$

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

2,4-D x BAP

BAP (mg L ⁻¹)	2,4-D (mg L ⁻¹)				
	1	2	3	4	5
1	0.0000 cB	4.0000 aA	3.8333 aA	3.7800 aA	3.6700 aA
2	1.8900 aC	3.3333 bB	3.6700 aAB	3.7800 aAB	4.0000 aA
3	1.5567 aC	3.2233 bB	3.6667 aAB	3.7767 aA	3.8900 aA
4	1.0000 bB	3.4433 bA	3.5567 aA	3.6100 aA	3.7800 aA
5	1.0000 bB	3.5567 abA	3.7800 aA	3.7233 aA	3.5567 aA

dms para colunas = 0.5238 dms para linhas = 0.5238
 Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 3.16307 CV% = 7.16
 Ponto médio = 2.00000

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
 Shapiro-Wilk (W) 0.70435 0.00000 Não

APÊNDICE 4 : Análise de variância referente a Tabela 2 - Médias do peso da massa fresca (g) de calos em explantes de *C. frutescens* cv. Stromboli submetidos a combinações fatoriais de 2,4-D (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹) e BAP (0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg L⁻¹), após 49 dias de cultivo.

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
2,4-D(F1)	4	2.04702	0.51176	69.9311 **
BAP (F2)	4	0.93147	0.23287	31.8213 **
Int. F1xF2	16	1.57707	0.09857	13.4691 **
Tratamentos	24	4.55556	0.18982	25.9382 **
Resíduo	50	0.36590	0.00732	
Total	74	4.92146		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
4	50	3.7207	69.9311	<.0001
4	50	3.7207	31.8213	<.0001
16	50	2.3816	13.4691	<.0001
24	50	2.1844	25.9382	<.0001

Fator 1 = 2,4-D

Fator 2 = BAP

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1 (2,4-D)

1	0.72790 a
2	0.58959 b
3	0.42002 c
4	0.36592 c
5	0.26412 d

dms = 0.08844

Médias do fator 2 (BAP)

1	0.26822 c
2	0.52288 ab
3	0.59161 a
4	0.53021 ab
5	0.45464 b

dms = 0.08844

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

2,4-D x BAP

		2,4-D (mg L ⁻¹)				
BAP (mg L ⁻¹)	1	2	3	4	5	
1	0.0338 bD	1.1589 aA	0.9457 aB	0.7884 aBC	0.7207 aC	
2	0.4463 aB	0.5031 bAB	0.6869 bA	0.6712 abA	0.6406 aAB	
3	0.3131 aC	0.3525 bcBC	0.5296 bAB	0.5513 bcA	0.3536 bABC	
4	0.2899 aB	0.3483 bcAB	0.4910 bcA	0.3928 cdAB	0.3076 bAB	
5	0.2579 aA	0.2597 cA	0.3048 cA	0.2474 dA	0.2508 bA	

dms para colunas = 0.1978 dms para linhas = 0.1978
 Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 0.47351 CV% = 18.07
 Ponto médio = 0.61225

Normalidade dos dados (alfa = 5%)

 Teste (Estatística) Valor p-valor Normal
 Shapiro-Wilk (W) 0.92919 0.00042 Não